

**TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
FAKULTA TEXTILNÍ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

LIBEREC 2010

MICHAL JAROŠ

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA TEXTILNÍ



Studijní program: B3107 Textil

Studijní obor: 3107R007 Textilní marketing

ŘEZY VLÁKNY PROSTŘEDNICTVÍM FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE *FIBRE CROSS-SECTIONS TROUGH THE FLUORESCENCE MICROSCOPY*

Michal Jaroš

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Monika Vyšanská

Rozsah práce:

Počet stran textu ...	39
Počet obrázků	16
Počet tabulek	4
Počet grafů	0
Počet stran příloh .	13

Zadání

1. Proved'te literární a internetový průzkum na téma způsoby realizace příčných řezů textilními materiály, fluorescenčním mikroskopie a textilní materiály, zpracování barevného obrazu.
2. Zhotovte příčné řezy vláken různými laboratorními technikami.
3. Získejte obrazy příčných řezů pomocí fluorescenčního mikroskopu.
4. Zhodnoťte charakteristiky barevných obrazů.
5. Pokuste se vytvořit typické intervaly charakteristik barevných obrazů v závislosti na metodě získání řezu vláken.
6. Výsledky zhodnoťte.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že předložená bakalářská práce je původní a zpracovala jsem ji samostatně. Prohlašuji, že citace použitých pramenů je úplná, že jsem v práci neporušila autorská práva (ve smyslu zákona č. 121/2000 Sb. O právu autorském a o právech souvisejících s právem autorským).

Souhlasím s umístěním bakalářské práce v Univerzitní knihovně TUL.

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 (školní dílo).

Beru na vědomí, že TUL má právo na uzavření licenční smlouvy o užití mé bakalářské práce a prohlašuji, že **s o u h l a s í m** s případným užitím mé bakalářské práce (prodej, zapůjčení apod.).

Jsem si vědoma toho, že užít své bakalářské práce či poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem TUL, která má právo ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, vynaložených univerzitou na vytvoření díla (až do jejich skutečné výše).

V Liberci, dne 3. května 2010

Podpis.....

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych touto formou poděkoval Ing. Monice Vyšanské, která mi poskytovala cenné informace a rady. Také za její čas, jež věnovala konzultacím méjí bakalářské práce.

Poděkování patří i Ing. Larise Ocheretné, za pomoc při realizaci výzkumu na fluorescenčním mikroskopu.

V neposlední řadě jsem vděčný rodině, bez jejíž finanční i morální podpory bych studium zvládal velice těžko.

ANOTACE

Cílem této bakalářské práce je vytvořit příčné řezy vláken, vypracovat z nich barevné snímky prostřednictvím fluorescenčního mikroskopu a snímky analyzovat.

Teoretická část je věnována různým technikám výroby příčných řezů vlákny, popisu zkoumaných vláken, teorii fluorescence, mikroskopii a samotné fluorescenční mikroskopii. Také je zde zpracována teorie získávání digitálního obrazu a jeho analýzy.

V experimentální části je popsána výroba snímků na fluorescenčním mikroskopu a jejich analýza. Z těchto údajů jsou poté vytvářeny typické intervaly charakteristik barevných obrazů a vyvozeny závěry.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Řezy vlákny, fluorescence, analýza obrazu.

ANNOTATION

The aim of this thesis is to create cross-sections of fibers, create color pictures through the fluorescence microscope and analyze them.

Theoretical part deals with various techniques of producing cross-sections, the theory of fluorescence microscopy and fluorescence microscopy itself. The theory of digital image acquisition and analysis is also compiled here.

The experimental section describes the production of images on a fluorescent microscope analysis. These data are subsequently developed into typical frequency characteristics of these images and conclusions are made out of it.

KEY WORDS :

Cross-sections of fibers, fluorescence, image analysis.

OBSAH

Úvod	9
1. Příčné řezy.....	10
1.1 Způsoby realizace příčných řezů textilními vlákny.....	11
2. Zkoumaná vlákna	12
3. Světelný mikroskop	13
3.1 Fluorescenční mikroskop.....	14
3.2 Epifluorescenční mikroskop	16
3.3 Transmisní fluorescenční mikroskop.....	17
4. Teorie luminiscence.....	18
5. Využití fluorescenční mikroskopie v praxi	19
5.1 Využití fluorescenční mikroskopie v textilním průmyslu.....	20
6. Získávání barevného obrazu.....	21
6.1 Definice pojmu barva, její digitální zpracování.....	23
6.2 Analýza barevného obrazu.....	25
7. Použité materiály.....	26
7.1 Plán experimentu.....	27
8. Získávání barevných obrazů příčných řezů vláken	28
8.1 Pozorování pomocí modrého fluorescenčního filtru.....	32
9. Analýza barevného obrazu.....	33
9.1 Určení rozhodujících parametrů.....	33
9.2 Průměrná intenzita záření.....	34
9.3 Shodná rozdělení výběrů průměrné intenzity záření	37
9.4 Variace intenzity záření (IntensityVariation).....	38
Diskuse.....	40
Závěr	43
Seznam použité literatury.....	44
Seznam obrázků a tabulek.....	47
Seznam příloh.....	48

Seznam použitých zkratk a symbolů

95% IS	Interval spolehlivosti s 95% pravděpodobností
PAD	Polyamid
PES	Polyester
PAN	Polyakrylnitril
POP	Polypropylen
CIE	International Commission on Illumination

ÚVOD

Zkoumání textilních vláken pomocí mikroskopu se provádí již několik století. Postupně se zdokonalují jak metody, tak i samotné mikroskopy a vývoj se zdaleka nezastavil, jelikož jsou kladeny čím dál větší nároky na kvalitu výzkumu.

I když byl první světelný mikroskop vynalezen člověkem, který svá učňovská léta strávil v textilním skladu, rozšířil se tento vynález snad do všech technických odvětví, kde hraje větší, či menší roli. Ta sama pokračovala v jeho vývoji, bylo vynalezeno plno dalších variant a technických řešení. Jedním z nich je i fluorescenční mikroskopie, která svoje hlavní uplatnění našla v biologii.

Předkládaná práce se věnuje rešeršnímu zpracování metod tvorby příčných řezů, popisu zkoumaných vláken, teorii fluorescence, popisu světelného a fluorescenčního mikroskopu. Dále pak metodám zachycení obrazu a jeho digitalizace, která je důležitá pro další zpracování.

V experimentální části je poté popsána výroba příčných řezů textilními vlákny různými metodami a získávání jejich obrazů na fluorescenčním mikroskopu. V takto získaných obrazech jsou měřeny vybrané charakteristiky. Z nich jsou vytvořeny tabulky a grafy, z kterých bylo možné vyvodit závěry o vhodnosti jednotlivých metod tvorby příčných řezů a fluorescenčních vlastnostech textilních materiálů.

REŠERŠNÍ ČÁST

Rešeršní část této práce se bude zabývat samotnou výrobou příčných řezů vláken, dále teorií fluorescence, jejím využitím v textilním průmyslu a principem fluorescenčního mikroskopu. Na závěr je umístěna část o způsobu získávání barevného obrazu a jeho analýzy.

1. Příčné řezy

Pro zkoumání a pochopení struktury objektů je důležité znát jejich vnitřek. Nejjednodušším řešením je proto objekt rozříznout. U velkých objektů dříve stačila lidem pila, nebo nůž. S příchodem světelného mikroskopu ale začali lidé zkoumat stále menší objekty, které už nebylo jednoduché kvalitně rozříznout. Prvním zjednodušením bylo použití žiletky, která ale stále nedokázala vytvořit kvalitní řezy, o požadované tloušťce několika desítek mikrometrů. Proto byla mnoha vědci vyvíjena zařízení, která dokáží vyrobit řezy, o požadované tloušťce, až přišlo na svět zařízení zvané mikrotom. O zásluhy na jeho vynálezu se přelo mnoho lidí, dosud není jisté, kdo jej první vyrobil. Důležité ale je, že dodnes je nenahraditelný v mnoha oborech, jako je biologie, lékařství, textilní průmysl. Za dobu jeho existence vzniklo mnoho variant – ruční, rotační, sáňkový, laserový, ultrazvukový a mnoho dalších [14].

Mikrotom – Řezací zařízení, jehož pomocí můžeme vytvořit velmi tenké plátky. Využívá se ho pro výrobu řezů z biologických a měkkých materiálů, pro zkoumání na světleném mikroskopu. Preparát musí být většinou fixovaný a vytvrzený. Principem funkce je zajistit, aby řezací čepel mohla uříznout pouze námi požadovanou část materiálu a byla fixována ve stabilní poloze. Tloušťka uříznutého materiálu může být 1 – 100 μm [14].

Definice řezu textilií – Pokud protneme textilií rovinou, která svírá určený úhel se zvolenou osou, může hovořit o řezu textilií. Podélný řez je veden rovnoběžně ke směru průchodu textilie strojem, příčný řez je veden kolmo, ke směru průchodu textilie strojem. [9]

1.1 Způsoby realizace příčných řezů textilními vlákny

Řezy z destičky – Nejjednodušší způsob výroby příčných řezů vláken. Princip spočívá v provlečení svazku vláken dírkou v destičce a zpevnění lepidlem. Po vytvrzení se žiletkou seříznou oba přečnávající konce svazku. Spolu s destičkou vkládáme preparát pod mikroskop. Není ale možné vytvářet velmi tenké řezy, jejich tloušťka závisí na tloušťce destičky, která je omezená pevností materiálu. Můžeme hovořit o desetinách milimetru [15].

Řezy z ručního mikrotomu – Hojně používaný způsob, který není tolik pracný a časově náročný, poskytuje relativně kvalitní řezy. Princip spočívá v navázání pomocné nitě na svazek vláken, která jsou poté pověšena do svislé polohy a nepreparována disperzním lepidlem. Po vytvrzení lepidla je svazek vložen do ručního mikrotomu, kde pomocí vysunování šroubem určujeme, jak tlustý vzorek chceme vyrobit. Řez je prováděn žiletkou a můžeme dosáhnout minimální tloušťky vzorku 15 μm [15].

Měkké řezy – Nejvíce využívaný způsob, při používání následné obrazové analýzy. Princip spočívá navázání pomocných nití na okraje vlákna, následuje impregnace směsí disperzního lepidla a rychlosmáčecího prostředku. Po zasušení se znovu svazek naimpregnuje disperzním lepidlem a nechá zafixovaný usušit. Poté se zafixuje do plechové vaničky, kterou je nutno utěsnit izolepou, zalije se horkou směsí vosku a parafínu. Po tomto procesu se vanička i se vzorkem vloží do mrazničky, po zmrazení se bloček vyjme, seřízne žiletkou do tvaru pyramidy a je připraven k nařezání. Řezání bločků se provádí na mikrotomu. Pro následné mikroskopování je nutno vzorek zakápnout xylenem, který tvoří imerzní prostředí a rozpouští vosk. Můžeme dosáhnout minimální tloušťky 10 μm [9].

Tvrdé řezy – Nejpracnější způsob, který ale umožňuje vytvářet nejtenčí řezy. Princip spočívá v navázání vzorků na vytvarovaný měděný drátek. Poté se takto upevněný vzorek odmastí, naimpregnuje a prosytí roztoky nižší viskozity. Dále dojde k zalití prvním zalévacím médiem, tvořené převážně epoxidovou pryskyřicí a příměsemi. Po vytvrzení se vzorek vloží do želatinové kapsle, zalije druhým zalévacím médiem, které je

tvořeno epoxidovou pryskyřicí s příměsemi, doplněné o urychlovač. Polymerace trvá dva dny. Kapsle je rozpustná ve vodě, takže je lehké ji odstranit. Vzorek se poté seřízne do pyramidy, odstraní měděný drátek a je připraven k řezání na mikrotomu. Můžeme dosáhnout minimální tloušťky 3 μm [9].

2. Zkoumaná vlákna

Přírodní vlákna – dělíme je na rostlinná a živočišná. Rostlinná vznikají na bázi celulózy, což je polysacharid. Získáváme je ze semen, stonků, lodyh, nebo listů rostlin. Živočišná vlákna vznikají na bázi bílkovin. Můžeme je získat z srsti živočichů, nebo ze sekretu hmyzu.

Bavlna – jednobuněčná přírodní vlákna, obrůstající semena bavlníku. Její největší část tvoří celulóza (až 96%), dále pektiny, bílkoviny, vosky, organické kyseliny a další látky. Její struktura je tvořena povrchem, primární stěnou a sekundární stěnou.

Technický len – mnohobuněčná přírodní vlákna, tvořená svazkem elementárních vláken. Z největší části tvořena celulózou. Technický len je získáván z kůry rostliny. Elementární vlákna jsou dlouhé protáhlé buňky, v jejichž středu je malý kanálek, zvaný lumen.

Vlna – živočišná vlákna na bázi bílkovin (keratin), získané ze srsti ovce. Vlněné vlákno je bilaterální, skládající se ze dvou základních modifikací kortexu – orto a para, což způsobuje jeho otáčení do šroubovice. Vlákno je šupinaté, směrem od kůže se zužuje. Nejširší část je podsada, odrůstající v přechodový vlas a pesík.

Vlna merino – jemnější a měkčí vlákna od ovcí merinových

Viskóza – hlavní surovinou pro výrobu je přírodní polymer, který je získán regenerací celulózy, jež je získávána z rychle rostoucích dřevin. K polymerizaci je potřeba hydroxid sodný a sirouhlík. Vlákna slouží jako levnější náhražka přírodního hedvábí.

Syntetická vlákna - spojováním monomerů při chemických reakcích získáváme polymery, jejichž zvlákněním můžeme získat textilní vlákna. Jejich výhodou, oproti přírodním vláknům je, že mnohdy můžeme vyrábět vlákna s lepšími fyzikálními vlastnostmi, při menších finančních nákladech.

Polyamid – výchozím materiálem pro výrobu je ropa, vlákna složená z makromolekul s opakujícími se aramidovými skupinami, což zajišťuje vynikající mechanické vlastnosti, jako pevnost, odolnost v oděru, tahu atd.

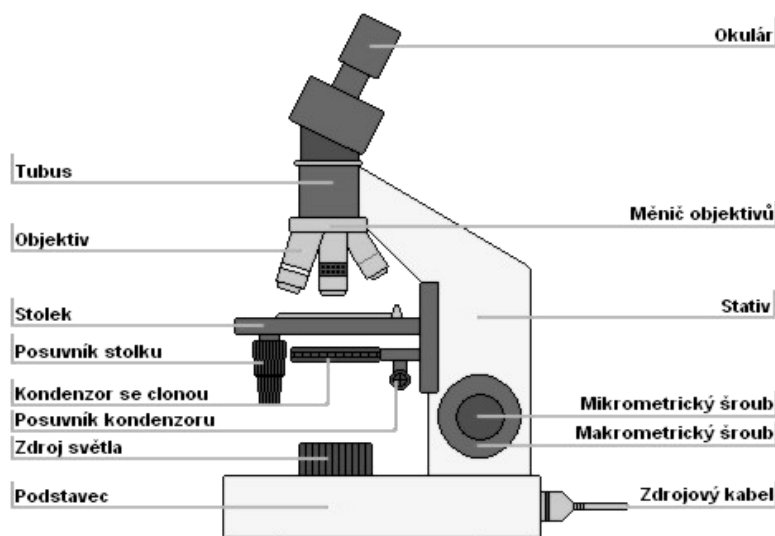
Polyester – výchozím materiálem pro výrobu je ropa. Polymer obsahuje esterovou funkční skupinu. Vlákna se mohou vyskytovat téměř ve všech textilních výrobních, má vysokou odolnost proti UV záření a malou navlhavost.

Polyakrylnitril – výroba akrylnitrilu z propylenu a amoniaku. Zvláknování za mokra, nebo sucha, metodou koagulace. Dobré omakové, horší mechanické vlastnosti.

Polypropylen – částečně krystalický plast, získaný polymerací propenu. Jeden z nejpoužívanějších syntetických materiálů. Vlákna s nejmenší plošnou hmotností, odolná vůči chemikáliím [15].

3. Světelný mikroskop

Princip vzniku obrazu - Vznik obrazu popisuje Hyugensův princip. Zaostrěný a osvětlený preparát se stává objektem, v němž se každý bod stává zdrojem sekundárních sférických vln. Každý tento bod má ale jiné optické vlastnosti, které dopadající světlo jinak transformují. Různě jej ohýbají, lámou mění amplitudu vlnění. Tyto sekundární vlny spolu pak interferují a vcházejí do objektivu. [19].



Obr. 1 Schéma světelného mikroskopu [22]

Stolek mikroskopu slouží k uložení a upevnění pozorovaného vzorku. Pozorovaný vzorek je uložen mezi podložné sklíčko, které má většinou standardizovanou velikost 76x26x1mm a krycí sklíčko, které musí mít tloušťku 0,17 mm, protože je na ní korigována většina objektivů. Preparát se poté přesouvá do optické osy mikroskopu pomocí podélného a příčného posuvu.

Uložený preparát je potřena zaostřit, což se provádí posuvem stolku, který je zajištěn dvěma posuvnými knoflíky, jeden pro hrubý posuv, druhý pro jemný, většinou po dílkách o velikosti 1 μm .

Tubus je další důležitou částí mikroskopu, kde se jedné straně nachází nástavec pro okulár, přes který se pozorovatel dívá. Tubus je konstruován buď pro jeden okulár, dva okuláry, pro možnost pozorování oběma očima, nebo takzvané triokulární, kde je možné připojit optické snímací zařízení, jako fotoaparát, či kameru. Okuláry mají většinou desetinásobné zvětšení a také dioptrickou korekci pro lidi s horším zrakem. Na druhé straně tubusu se nachází revolverový nástavec pro objektivy. Ten může pojmout až 6 výměnných objektivů.

Osvětlení mikroskopu je zajištěno halogenovou žárovkou s výkonem až 100W. Ta je napájena z transformátoru, který upravuje síťové napájení.

Kondenzor se nachází v dráze paprsků světla, vystupujících z žárovky, pod posuvným stolkem s preparátem. Je opatřen clonou, kterou ovládáme páčkou a regulujeme tím množství procházejícího světla. Regulovat procházející světlo je důležité z důvodu, aby byla co nejlépe využita rozlišovací schopnost objektivů [19].

3.1 Fluorescenční mikroskop

Na začátku dvacátého století byl již světelný mikroskop na hranici svých možností a nedokázal poskytovat potřebné informace o buněčných strukturách, jaké tehdejší vědci potřebovali. Začaly proto první pokusy s UV světlem, používání filtrů, propouštějící různé vlnové délky a v roce 1913 byl vynalezen první fluorescenční mikroskop. Časem byl zdokonalován do dnešní podoby, kdy dokáže zobrazit fluorofory v buňkách, které

jsou tam obsažené ve velmi malé množství a dokáže rozeznat strukturu objektů na molekulární úrovni. [11]

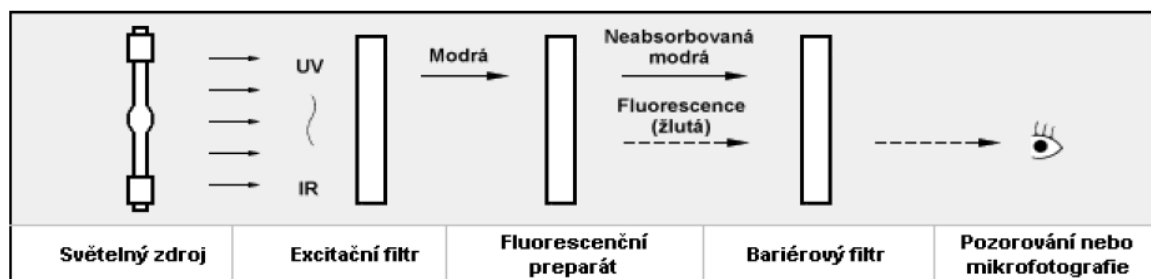
Fluorescenční mikroskop obsahuje velmi výkonnou optickou soustavu a snímání pomocí CCD kamery, které dokáží pozorovaný objekt snímat a zachytit ve vysokém rozlišení, na což lidské oko nestačí. V dnešní době je nejuznávanějším výrobcem fluorescenčních mikroskopů firma Olympus [18].



Obr. 2 Fluorescenční mikroskop Olympus IX 70 [18]

Fluorescenční mikroskopii dělíme na dvě skupiny. **Epifluorescenční**, kde pozorujeme v odraženém světle a **transmisní**, kde pozorujeme v procházejícím světle. V současnosti se pozorování v procházejícím světle téměř nepoužívá. Ve fluorescenční mikroskopii pozorujeme pouze fluorofory, které se objevují jenom tam, kde se nachází i námi pozorovaná látka. Obraz je pak vytvořen světlem, které je vytvořeno z fluorescence a není rušeno žádným jiným vlivem [17].

3.2 Epifluorescenční mikroskop



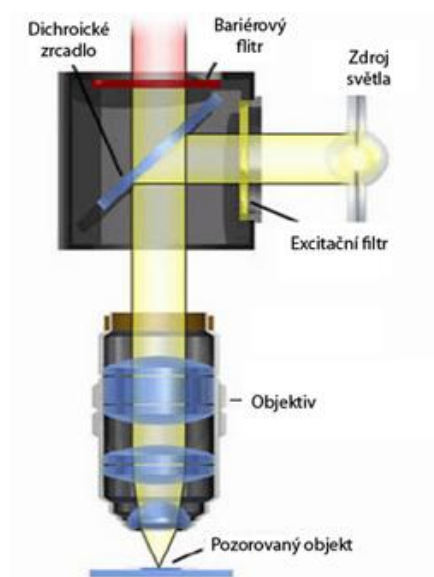
Obr. 3 Základní schéma průchodu světla epifluorescenčním mikroskopem [23]

Základní součástí je zdroj světla, který musí vyzařovat na určité vlnové délce, většinou v oblasti UV a IR záření a zajišťuje dopadání světla na pozorovaný objekt. Jako zdroj záření se ve většině případů používá vysokotlaká rtuťová výbojka, nebo halogenová žárovka. Výbojka je napájena přes samostatný síťový zdroj, neboli startér, ze sítě na 220V.

Další důležitou součástí mikroskopu je fluorescenční filtr. Ten se skládá z excitačního filtru, závěrného filtru a diachronického zrcadla. V mikroskopu můžeme používat více druhů filtrů, které se liší vymezením pásma propustnosti excitačního a závěrného filtru a tím propouští různé vlnové délky. Proto je nutné používat pro každé fluorescenční barvivo určitý filtr. Je také možnost využití více filtrů, nebo i vícepásmových filtrů [11] [17] [20].

Složení fluorescenčního filtru:

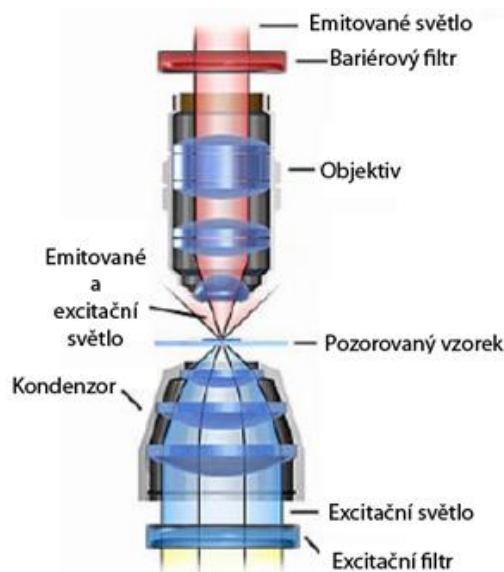
- Excitační filtr - pohlcuje všechno světlo, kromě světla potřebného v fluorescenci vzorku, z barevného světla propouští jen část vlnové délky.
- Bariérový filtr - propouští pouze fluorescenční světlo. Světlo, které nebylo použito k excitaci pohlcuje. Může také nechávat projít jen část fluorescenčního spektra.
- Dichroické zrcadlo – podle vlnové délky buď světlo odráží, nebo propouští, jeho úkolem je propustit maximum emisního světla a odrazit maximum excitačního světla [8] [17]



Obr. 4 Schéma epifluorescenčního mikroskopu [23]

3.3 Transmisní fluorescenční mikroskop

Předchůdce epifluorescenčního mikroskopu, kde je objekt pozorován v procházejícím světle. Světlo prochází excitačním filtrem, dopadá na vzorek ze spodu, podobně jako u světelného mikroskopu a objektiv zachytává pouze vzorkem emitované světlo. Pro osvětlení vzorku je použit nástinový kondenzor, který odráží světlo tak, aby dopadlo na vzorek z boku. Excitační světlo tak dopadá mimo objektiv [11] [17] [20].



Obr. 5 Schéma transmisního fluorescenčního mikroskopu [23]

4. Teorie Luminiscence

Luminiscence vzniká excitací atomu. Excitace je fyzikální proces, kdy dochází k přechodu energetického stavu atomu na vyšší energetickou hladinu. Může jí způsobit absorpce fotonu, působením tepla, nebo i tlaku. Excitovaný atom má snahu vrátit se do základního stavu a při tom se uvolňuje energie, která má za následek vyzáření fotonu. V přírodě můžeme tento jev vidět například u světlušek, nebo různých mořských živočichů [2] [11] [12].

Luminiscenci můžeme dělit podle způsobu, jakým byla vyvolána:

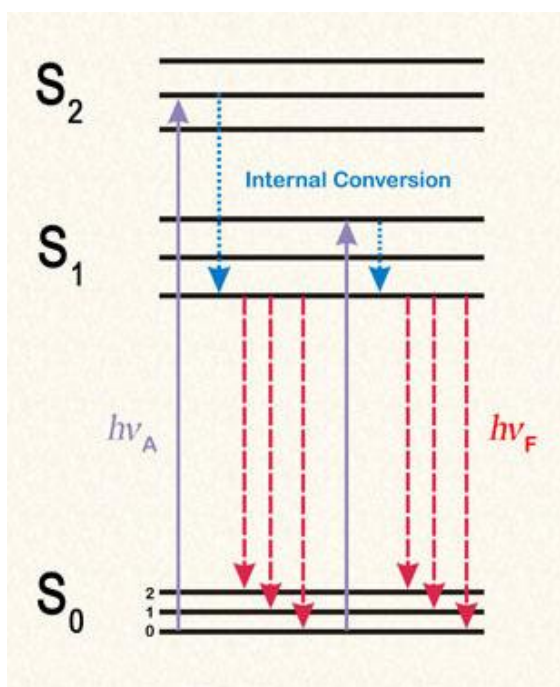
- elektroluminiscence (elektrické pole)
- katodoluminiscence (dopadající elektrony)
- termoluminiscence (vzrůst teploty)
- chemiluminiscence (chemická reakce)
- radioluminiscence (jaderné záření)
- triboluminiscence (tlak)
- fotoluminiscence (UV, nebo viditelné záření).

V této práci je zkoumán hlavně jev fotoluminiscence, při kterém záření, o kratší vlnové délce, vyvolává v obvykle pevných, nebo kapalných látkách, záření o vyšších vlnových délkách

Známe dva typy fotoluminiscence:

Fosforescence - pokud od látky odstraníme zdroj ozařování a luminiscence přetrvává, hovoříme o fosforescenci. Vyzařování může trvat až několik minut.

Fluorescence - pokud od látky odstraníme zdroj ozařování a luminiscence za pár nanosekund vymizí, hovoříme o fluorescenci [11] [12].



Obr. 6 Jablonskiho diagram fluorescence [3]

Na obrázku je vidět, jak atom přestupuje ze základní hladiny S_0 do vyšší energetické hladiny S_2 . Ale atom má snahu se vrátit do své základní energetické hladiny. Z hladiny S_2 sestupuje vibrační relaxací do hladiny S_1 a uvolňuje při tom teplo. Při přechodu do hladiny S_0 vyzáří foton, který vnímáme jako fluorescenci [3].

Při fluorescenční mikroskopii je důležité, zda vzorek obsahuje látky, které vyvolávají fluorescenci, takzvané fluorofory. Pokud tyto látky obsahuje, hovoříme, že je předmět autofluorescenční a obsahuje vnitřní fluorofory. Pokud ne, je třeba dodat vnější fluorofory [11].

Autofluorescenční jsou většinou materiály rostlinného a živočišného původu, jako jsou například mořské řasy, jejichž fluorforem je chlorofyl.

5. Využití fluorescenční mikroskopie v praxi

V dnešní době má fluorescenční mikroskopie a samotné využívání fluorescence mnoho oborů, ve kterých se může uplatnit. Můžeme například uvést archeologii, kriminalistiku a ochrana životního prostředí. Svoje hlavní uplatnění ale tento obor našel v biologii.

Biologie je obor, ve kterém je mikroskopie nezbytnou součástí. Světelný mikroskop dávno přestal stačit, proto byly nacházeny a používány stále nové mikroskopické metody. Fluorescence je využíváno v případech, kdy je potřeba zviditelnit určité struktury, nebo látky v buňce. Při metodě, která je nazývána přímá fluorescence, je použito fluorochromů, které se samy váží na určité molekuly, které potom zviditelní. Toho je například využito u molekul DNA.

Pro velkou část struktur v buňce není ale možné najít fluorochrom, který by se na ní sám vázal. Proto byla vyvinuta metoda přímé imunofluorescence, kde je vyráběna protilátka, která se váže na molekuly a je do ní možné přidat fluorochrom.

Další metodou je nepřímá imunofluorescence, kdy se v nějakém laboratorním zvířeti připraví specifická protilátka, proti naší molekule a poté se nechá navázat na tuto molekulu. Primární protilátka je poté mytím odstraněna. Zbylá protilátka, která je navázána na námi hledané struktury, se spojí s fluoresceinem a zviditelní požadovanou strukturu [2] [4].

Příklad využívaných fluoroforů:

- FITC (fluorescein isothiokyanát) – maximum emise mezi 500-600 nm. Široce používán při imunofluorescenci.
- Hoechst (bisbenzimid) – barví DNA.
- DAPI – váže se na DNA a RNA (barví se modře).
- Ethidium bromid – váže se na dvouřetězcovou DNA a RNA (svítí oranžově).
- Propidium Jodid – Barví DNA (červeně).
- Acridinová oranž – váže se na DNA (barví se zeleně) a RNA (barví se tmavě červeně) [2]

5.1 Využití fluorescenční mikroskopie v textilním průmyslu

V textilním průmyslu se fluorescenční mikroskopie teprve začíná prosazovat. Zatím není mnoho aplikací, kde by bylo tohoto oboru hromadněji využíváno. V různých laboratorních zařízeních je spíše zkoušeno, kde by se mohla najít její uplatnění, v čem

může posloužit lépe, než stávající laboratorní techniky. Jedná se například o pokusy s identifikací optických zjasňovacích prostředků, barev, změn struktury vláken apod. Výhodou je, že není potřeba do struktury vláken, nebo vlákenných soustav nějak výrazněji zasahovat a porušovat ji.

O jisté spojitosti s textilem se dá hovořit u policejních vyšetřovacích metod, kdy je pomocí fluorescence, která se objeví pod ultrafialovým světlem, zjišťována přítomnost lidské DNA. O další spojitosti s textilem je možné hovořit při archeologických průzkumech, kde se zkoumají zbytky textilu i několik tisíc let staré. Jsou popisovány experimenty na zachovaných vzorcích textilu, které se nacházely v jeskyních, v oblasti Mrtvého moře. Vzorky pocházely z doby kolem sta let před naším letopočtem, kdy se schovávali Židé v jeskyních, při povstání proti Římanům. V nalezišti se nacházely textilie, které byly identifikovány jako vlněné oděvy, povlečení a různé další předměty. Zkoumáním těchto nálezů mělo dát odpověď, co v té době Římané a Židé nosili. Vlákna byla zkoumána různými metodami mikroskopie, včetně fluorescenční. Při fluorescenční mikroskopii bylo vyrobeno několik referenčních vzorků vláken, různých materiálů a podle nich se určovalo materiálové složení nálezu. Z výsledků bylo patrné, že většinu materiálu tvořila vlna a len. Byla také zjištěna přítomnost organických barviv a mořidla pro jejich zachování [17].

6. Získávání barevného obrazu

Získat, analyzovat a zpracovat obraz reálných předmětů se snaží lidé už od počátku své existence. Za dlouhé období se technika a prostředky samozřejmě zdokonalily. V technických oborech se snažíme obraz co nejvěrněji zachytit a zároveň analyzovat jeho vlastnosti lépe, než nám dovolí náš zrakový orgán. Lidské oko je jednoduchá optická soustava, tvořená čočkou, adaptabilní clonou, zrakovými receptory, které jsou umístěny na sítnici a složeny ze 120 miliónů tyčinek, umožňující vnímat stupně šedi. Dále 7 miliónů čípků, umožňující barevné vidění. Mozek však není schopen takového množství informací v krátkém čase zpracovat a proto nám poskytuje jen nedokonalý komplex informací, které mohou být za určitých okolností zkreslené takzvanými klamy a

obraz tak můžeme vnímat zkresleně. Proto bylo nutné vytvořit zařízení, které obraz dokáže dokonale zanalyzovat samo, poskytne nám informace přesné a nezkreslené.

Princip digitalizace spočívá v nasnímání reálného obrazu a vytvoření obrazu digitálního.

K tomu nám může posloužit digitální fotoaparát, kamera, nebo skener. Tato zařízení rozloží obraz na jednotlivé body (pixely) a my jej pak můžeme uložit v datovém formátu, většinou .jpg. Proces se tedy skládá ze 3 kroků – Snímání obrazu, digitalizace obrazu, předzpracování obrazu.

Snímání obrazu – Pomocí výše vypsanych zařízení převádíme optické veličiny na spojitý elektrický signál. Tento signál je spojitý v čase a úrovni. Snímání můžeme provést v jednom spektrálním pásmu, nebo ve třech spektrálních pásmech, kdy hovoříme o barevném snímání.

Digitalizace obrazu – V tomto kroku je převáděn vstupní spojitý signál do diskrétního tvaru. Vstupní signál je popsán funkcí $f(x,y)$, kdy hodnoty v závorce označují souřadnice v obraze a funkce popisuje vlastnosti obrazu, jako je například jas. Samotná digitalizace se poté provede pomocí kvantování a vzorkování. Výsledkem je matice přirozených čísel $M \times N$, popisující obraz

Vzorkování – Při tomto procesu se odebírají hodnoty ve stejných intervalech. Je potřeba určit uspořádání vzorkovací mřížky, kdy máme na výběr ze mnohoúhelníkových struktur, pokrývajících celou plochu a to čtvercovou, hexagonální a trojúhelníkovou. V praxi se nejvíce využívá čtvercová, která má nejvíce odpovídá reprezentaci obrazu pomocí matice čísel.

Dále je potřeba určit vzorkovací frekvenci, která určí vzdálenost mezi vzorkovacími body v obraze. Vzdálenost se určuje podle Shannonovy věty, která říká: „Vzorkovací frekvence musí být alespoň dvakrát vyšší, než nejvyšší frekvence ve vzorkovacím signálu“. A dále by měl být interval menší, nebo roven polovině rozměru nejmenších detailů v obraze. Takto navzorkovaný bod tvoří jeden pixel. Když poskládáme jednotlivé pixely do mřížky, pokryjí celý obraz.

Kvantování - Každému intervalu je přiřazena jedna zástupná hodnota. Hovoříme také o diskretizaci oboru hodnot obrazové funkce. Vzorkovaný obraz je tvořen amplitudou a tato amplituda musí být vyjádřena jako souhrn digitálních údajů. Toto se provádí například u jasu, kdy je nekonečně mnoho jasových úrovní, které tvoří amplitudu, omezeno na x úrovní. Jasových úrovní by ale mělo být tolik, aby nevznikala kvantizační chyba, která způsobí na původně hladkém obraze, s hladkým barevným přechodem, skokové změny a vznik hran. Dá se říci, že čím je více kvantových hladin, tím je obraz kvalitnější a reálnější.

Předzpracování obrazu- V posledním kroku už je vstupem i výstupem diskrétní obraz, který je dále přizpůsobován lidskému oku. Je odstraněn šum, zvýrazňuje se kontrast, hrany. Poté je možné provést segmentaci, kde se pomocí prahování hledají objekty, se kterými se bude pracovat, části, které nejsou potřeba jsou odstraněny [6] [7] [21].

6.1 Definice pojmu barva, její digitální zpracování

Světlo je ve své podstatě elektromagnetické vlnění, které se liší svojí vlnovou délkou. Vlnová délka viditelného světla je 370 – 720 nm. Světlo odchází ze svého zdroje a odráží se od okolních předmětů do našeho oka. Každý předmět odráží různé vlnové délky, jiné zase pohlcuje. Dopadající světlo do lidského oka tak má různé zastoupení intenzit barevného spektra a člověk tak vnímá různé barvy. Dominantní frekvence pak určuje, jakou barvu vnímáme. Čím více tato frekvence převládá nad ostatními, tím má vyšší intenzitu a čím je frekvenční pásmo užší, tím je větší sytost.

Jednotlivé vlnění se ale mohou lišit pouze drobným rozdílem vlnové délky, takže by s tak ohromným božstvím barev nešlo při snímání a zpracovávání na počítači pracovat. Proto jsou různé délky vlnění rozděleny do spektrálních pásem.

V digitálním světě je používán základní model model RGB (červená, zelená, modrá), kde je jakákoliv barva složitelná z tří těchto barev. Pokud jsou zastoupeny maximální intenzitou, vzniká barva černá, pokud není zastoupená žádná, vzniká bílá barva [6].

Vlnové délky základních barev:

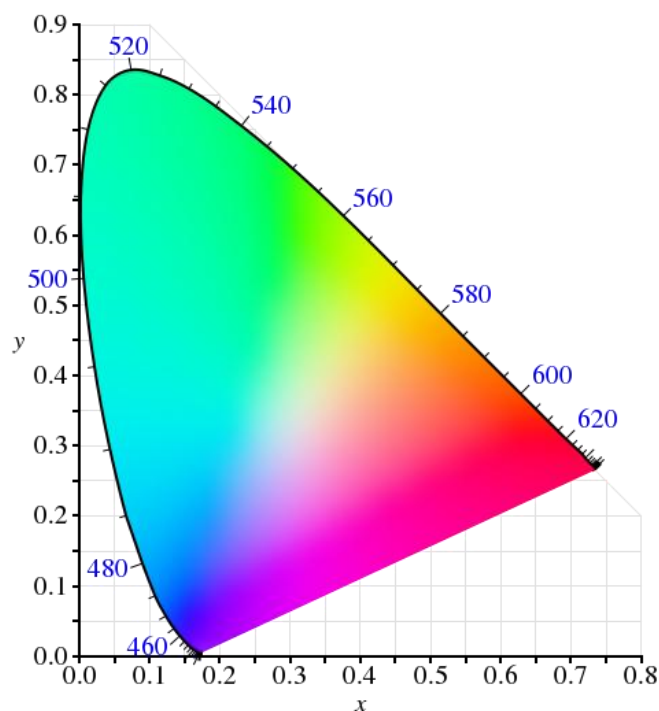
- Červená – 700 nm
- Zelená – 546,1 nm
- Modrá – 435,8 nm

Skládání barev:

Aditivní – Na tomto principu pracuje například monitor, nebo televize. Princip je v tom, že když budeme svítit na bílý objekt různými barvami, bude výsledná barva součtem těchto složek. Proto také mluvíme o součtovém míchání barev.

Substraktní – Princip funkce barevné tiskárny. Přidáním další barvy dojde k jejímu odečtení, takže pokud přidáme všechny barvy, získáme barvu černou. Mluvíme také o rozdílovém míchání barev [13]

Mezinárodní komise, která se zabývá problematikou barev a světla se nazývá „Commission Internationale de l'Éclairage“, zkráceně CIE. Tato komise stanovila v roce 1931 matematicky definovaný barevný prostor, definovaný složkami x,y,z. Barevný prostor je definován souřadnicemi „x,y“, složka „z“ určuje jas.



Obr. 7 Chromatický diagram barevného obrazu v souřadnicovém systému CIE xyz [13]

6.2 Analýza barevného obrazu

Samotná analýza se provádí v programech, které jsou schopny pracovat právě s těmito formáty dat. Nejčastěji používanými programy v našem textilním oboru jsou Lucia Cytogenetics a NIS – elements, od společnosti Laboratory Imaging [10]

NIS - elements nabízí pro měření charakteru barevného obrazu tyto parametry:

MeanIntensity - hodnota střední intenzity se odvozuje z histogramu intenzit. Je to obvyklý statistický průměr z hodnot intenzity obrazových bodů.

IntensityVariation - variace intenzity je odvozena z histogramu intenzity. Je to obvyklá standardní odchylka hodnot intenzit. Tento příznak popisuje vnitřní strukturu objektu nebo pole.

MeanBlue - střední modrá je střední hodnota intenzit z modré složky pixelů. Je to obvyklý statistický průměr z hodnot intenzity modré složky.

HueTypical - typický odstín je hodnota odstínu (hue) s maximální frekvencí v histogramu odstínu. Tento příznak popisuje nejpoužívanější odstín (barvu) v objektu, či v poli.

HueVariation - variace odstínu je obvyklá standardní odchylka hodnot odstínu (hue). Tento příznak popisuje rozdělení odstínu (barvy) ve vnitřní struktuře objektu, či pole.

MeanSaturation - střední saturace (sytost) je statistický průměr hodnot saturace obrazových bodů.

MeanBrightness - střední jas je obvyklý statistický průměr z hodnot jasu pixelů. Systém NIS-Elements používá k vyhodnocení tohoto parametru kalibrační křivku jasu.

BrightVariation – variace jasu je odvozena z hodnot jasu pixelů. Tento příznak popisuje rozdělení jasu ve vnitřní struktuře objektu, či poli.

x - souřadnice v barevném systému CIE-xy.

y - souřadnice v barevném systému CIE-xy.

[10]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části je vytvořit příčné řezy vláken, různými laboratorními technikami a získat jejich obrazy pomocí fluorescenčního mikroskopu. Z takto získaných barevných obrazů vyhodnotit jejich charakteristiky a vytvořit jejich typické intervaly, v závislosti na metodě získání řezu vláken. Poté výsledky zhodnotit. K dispozici bylo několik druhů vláken, přírodní i syntetická. Mikroskopování probíhalo na katedře KHT, pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX51.

7. Použité materiály

Z předchozích zkušeností při pozorování textilních vláken na fluorescenčním mikroskopu bylo zjištěno, že textilní vlákna z různých materiálů se v UV světle chovají velmi odlišně. Zatímco přírodní vlákna obsahují takové množství fluoforu, že jejich pozorování na fluorescenčním mikroskopu je možné, pozorování fluorescence u syntetických vláken je obtížnější. Proto byly zvoleny pro pozorování vlákna přírodní, rostlinného a živočišného původu. Dále bylo vybráno několik syntetických vláken, které měla mít podle předpokladů autofluorescenci mnohem menší. Jejich seznam najdeme v tabulce (viz tab. 1).

Tab. 1 Použité materiály

Přírodní vlákna	Syntetická vlákna
Rostlinná	
Bavlna	Polyamid matovaný (PAD)
Technický len	Polyester (PES)
Viskóza	Polyakrylonitril (PAN)
Živočišná	Polypropylen (POP)
Vlna	Polypropylen černý
Vlna Merino	

7.1 Plán experimentu

Z výše popsaných laboratorních technik, výroby příčných řezů vláken (viz. kap 1.1), byly vybrány řezy z ručního mikrotomu a měkké řezy. Od řezů z destičky bylo upuštěno, protože nejsou pro účely této práce dostatečně kvalitní, z ručního mikrotomu je můžeme vytvořit tenčí a kvalitnější. Měkké a tvrdé řezy jsou svojí kvalitou srovnatelné, rozdílem pouze je, že výroba tvrdých řezů je časově i technicky mnohem více náročnější.

Po prvních testech na fluorescenčním mikroskopu také vyšlo najevo, že svojí roli bude také hrát imerzní prostředí a potvrdil se předpoklad, že vlastnosti získaných barevných obrazů budou závislé na okolním světelném prostředí, jelikož mikroskop není v temné komoře, kde můžeme zajistit konstantní světelné prostředí.

Z těchto poznatků vznikl plán experimentu získávání příčných řezů vláken:

- Z vybraných materiálů vytvořit příčné řezy vláken pomocí ručního mikrotomu a metodou měkkých řezů.
- Jako imerzní prostředí pro měkké řezy bude použit xylen. Xylen je těkavá látka rozpouštějící vosk. Dále budou vytvářeny obrazy všech materiálů s rozpuštěným voskem a zaschlým voskem (vyprchaný xylén). U řezů, vyrobených na ručním mikrotomu bude použit glycerin a voda, pro všechny materiály zvlášť.
- Pro průzkum vlivu světelného prostředí budou materiály v různých imerzních prostředích pozorovány v odpoledních a nočních hodinách.
Odpoledních hodinách bude dbáno na to, aby probíhala měření v přibližně stejných časových úsecích dne (12-15 hodin), pokud možno při žádné oblačnosti. V nočních hodinách bude pomocí zatažených žaluzií a zhasnutých svítidel zajištěna tma jako v temné komoře.

8. Získávání barevných obrazů příčných řezů vláken

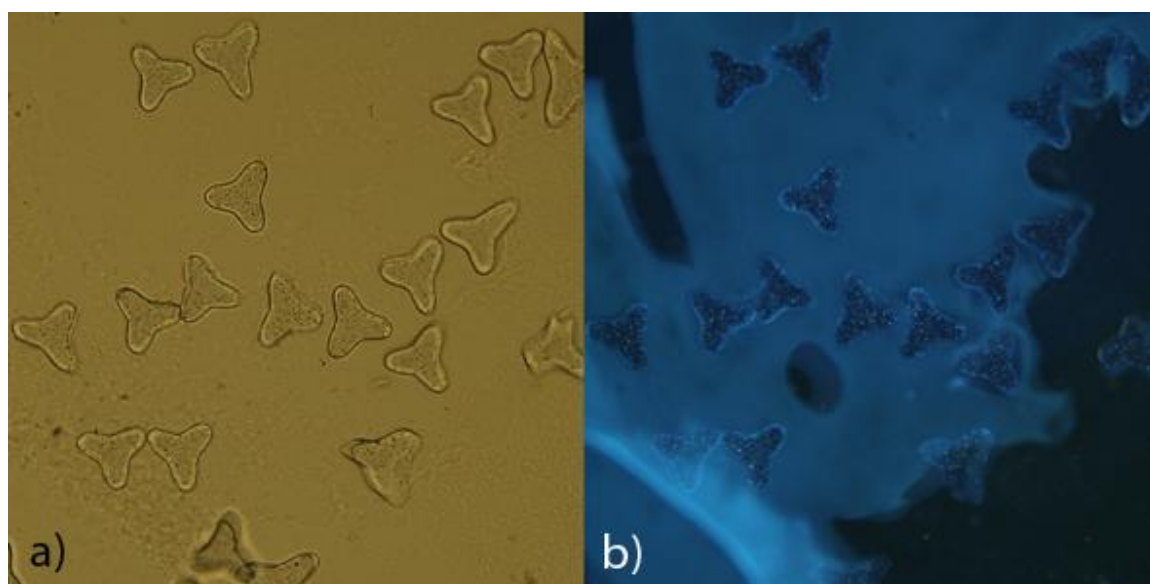
Po úspěšném vytvoření příčných řezů vláken zvolenými technikami, přišlo na řadu samotné zkoumání na fluorescenčním mikroskopu a následné vytváření barevných obrazů. Snímací zařízení mikroskopu bylo nastaveno na automatickou dobu expozice, která je přímo určena pro zkoumání fluorescence.

Při zkoumání měkkých řezů v xylenu probíhalo vše úspěšně, podařilo se vytvořit kvalitní obrazy všech vláken z různých materiálů, v denním světle i ve tmě. Také se podařilo vytvořit snímky se zaschlým voskem, kdy xylen vytékal. Tato metoda byla ale velice náročná, jelikož nebylo snadné najít vlákna v zdeformovaném a tmavém povrchu zaschlého vosku.

Z řezů vytvořených na ručním mikrotomu, v imerzním prostředí glycerinu, již nebylo možné vytvořit snímky všech druhů vláken. U některých materiálů nedokázalo snímací zařízení, při automatické době expozice, najít fluorescenci vůbec, u některých jen velice slabou. Kvalitnější snímky se podařilo vytvořit pouze u přírodních vláken bavlny, vlny a vlny merino. Slabou fluorescenci pak u polyamidu, polyakrionitrilu a polypropylenu. Toto se opakovalo v denním světle i ve tmě.

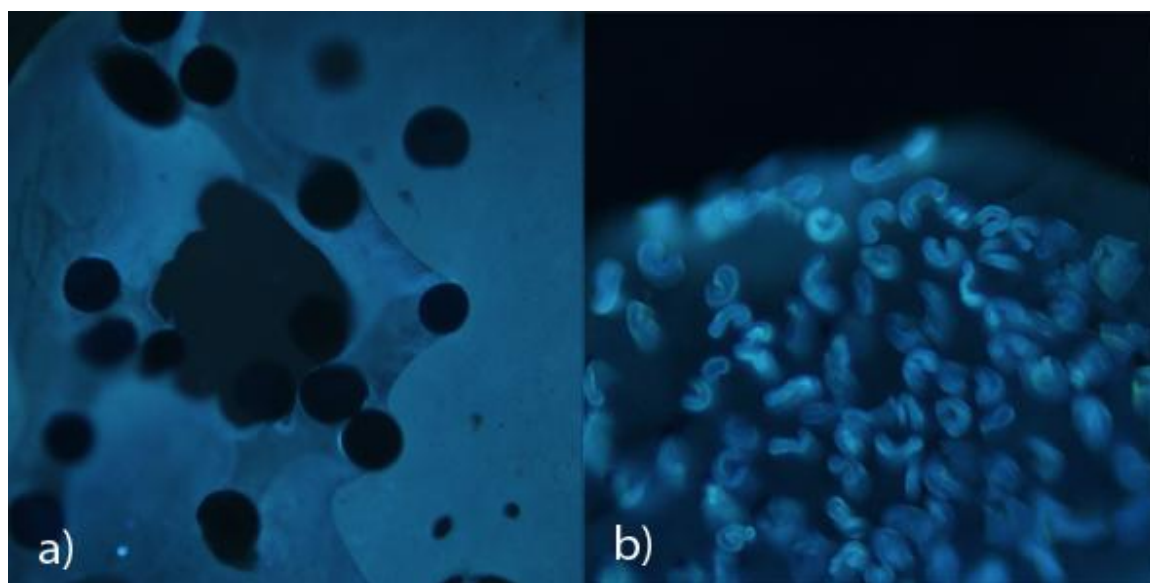
Při zkoumání řezů z ručního mikrotomu v imerzním prostředí vody byla situace ještě horší, fluorescenci se podařilo zachytit pouze u přírodních vláken bavlny, vlny a vlny merino, u ostatních materiálů nedokázal mikroskop zachytit ani slabou fluorescenci.

Na následných ukázkách vyrobených snímků jsou popsány rozdíly v různých imerzních prostředích a světelných podmínkách. Nejsou zde ukázány snímky všech materiálů, tato část slouží spíš pro porovnání laboratorních technik.



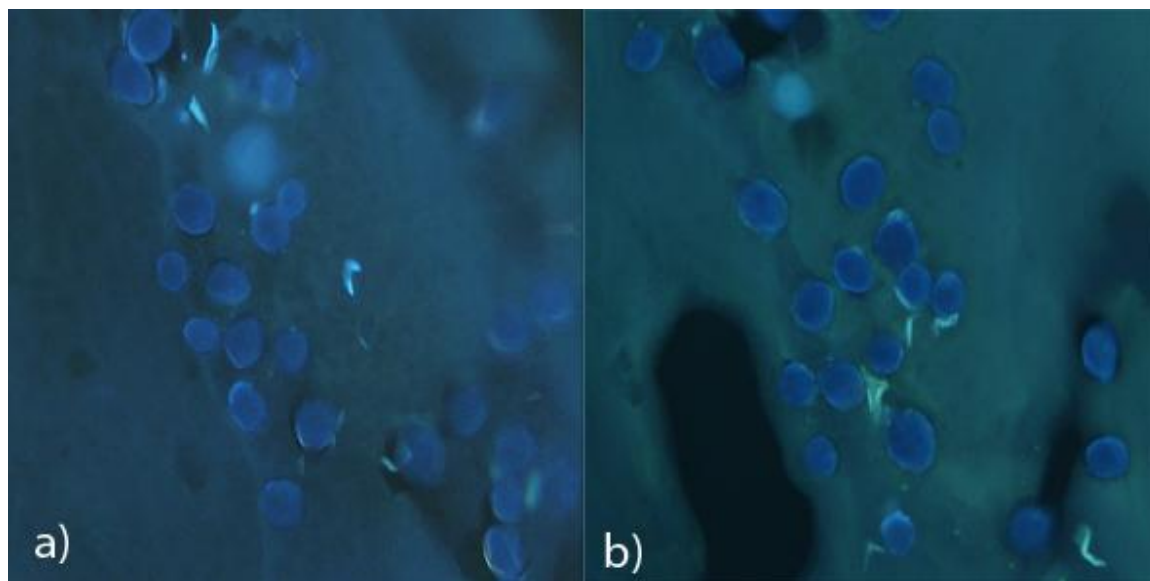
Obr. 8 Polyamid a) režim světelného mikroskopu b) režim fluorescence

Z obr. 8 je jasný rozdíl mezi prohlížením v procházejícím světle a v UV světle, při fluorescenční mikroskopii. Na obou obrázcích jsou patrné hranice objektů, i jejich struktura.



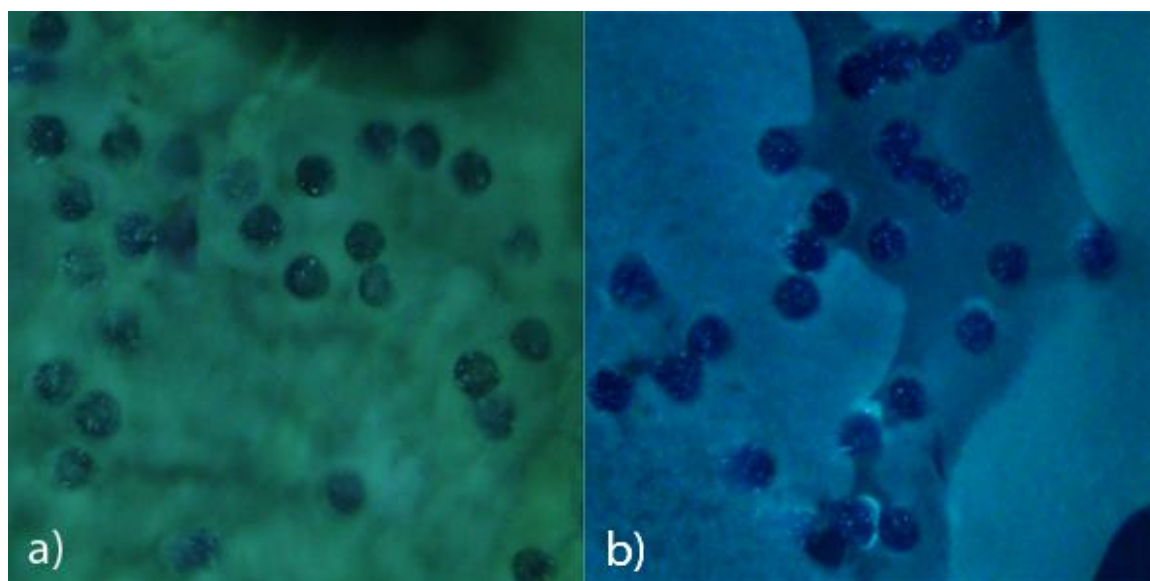
Obr. 9 a) Polyester černý xylen tma b) Bavlna xylen tma

Na obr. 9 je vidět rozdíl mezi fluorescencí syntetického a přírodního vlákna. Černý polyester neobsahuje žádné fluofory, takže se jeví v pozadí disperzního lepidla jako černý flek, zatímco bavlna, přírodní autofluorescent, vyniká nad pozadím a je jasně rozeznatelná.



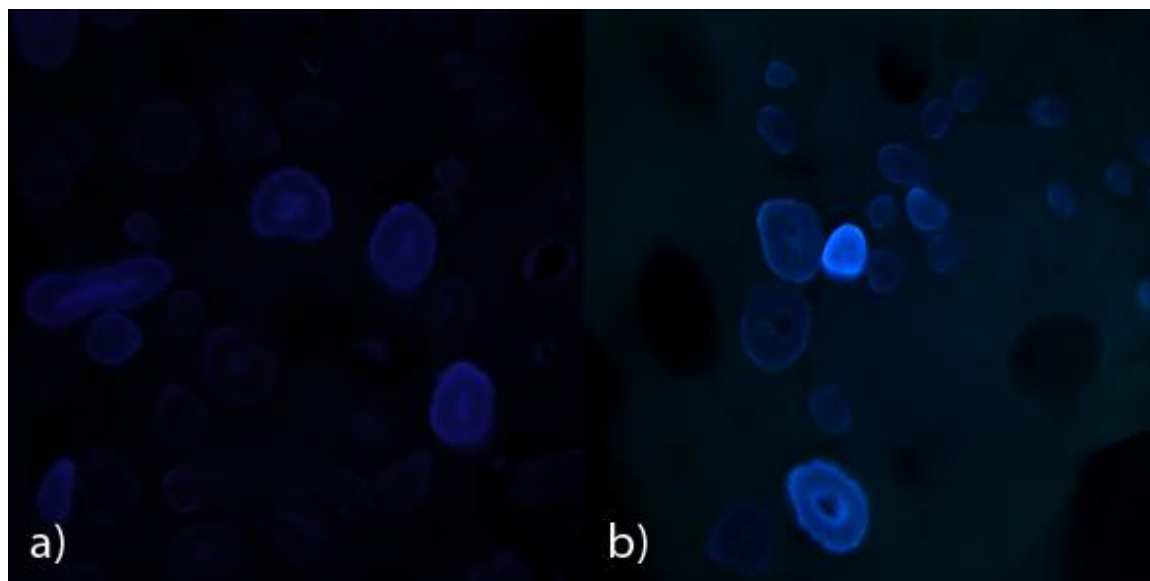
Obr. 10 a) Vlna merino xylen tma b) Vlna merino xylen denní světlo

Na obr. 10 je vidět malý rozdíl mezi měřením ve tmě a v denním světle. Pozadí při nočním měření má lehce odlišnou barvu a u měření ve dne více vynikají řezy vláken a na první pohled se zdá, že mají vyšší intenzitu záření, což se později měřením potvrdilo.



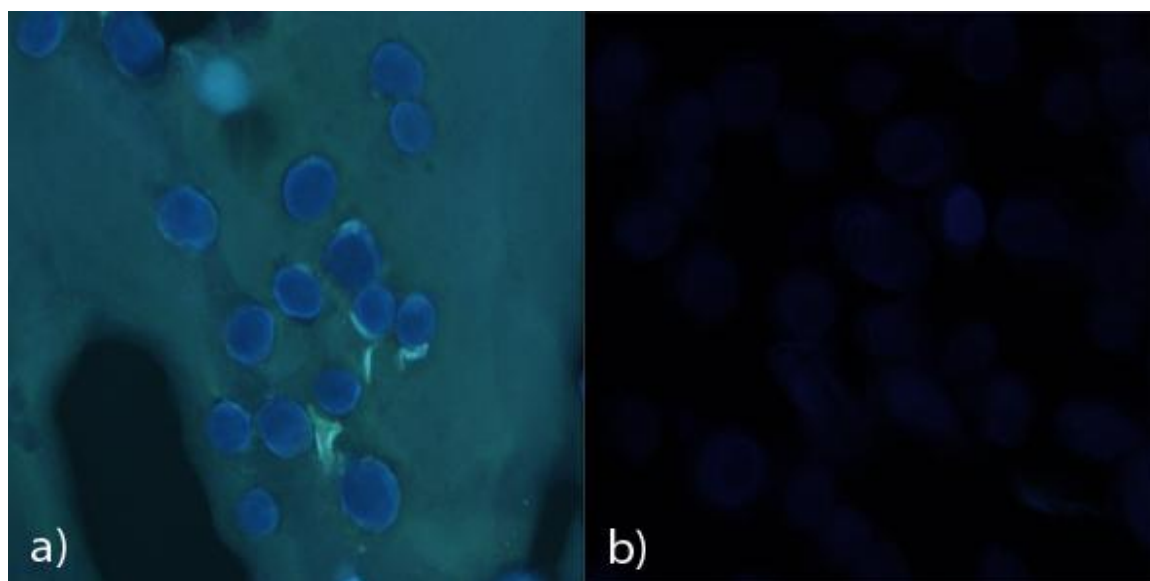
Obr. 11 a) PES sucho b) PES xylen noc

Na obr. 11a) je vidět, jaký rozdíl v barvě fluorescence pozadí způsobí vytékání xylenu, takže probíhá měření na sucho. I samotná vlákna vykazují nižší intenzitu záření, než při pozorování s imerzním prostředím.



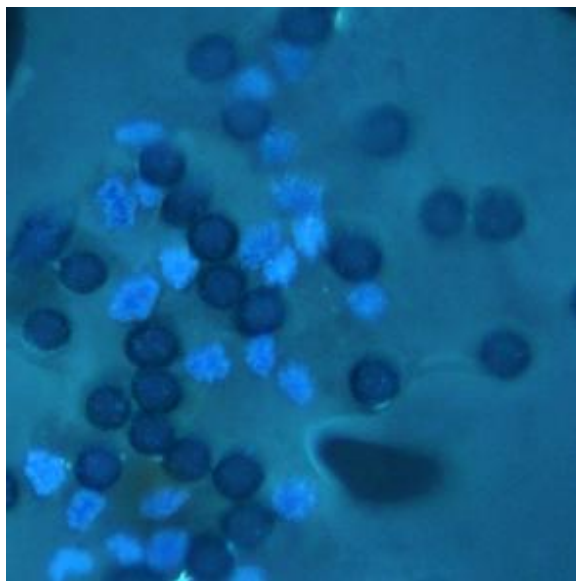
Obr. 12 a) Vlna glycerin denní světlo b) Vlna xylen denní světlo

Vlna (obr.12) byla jedním z mála materiálů, u kterého se dala zachytit v imerzním prostředí glycerinu vyšší fluorescence vláken. Intenzita záření byla ale u všech zachycených případů vždy vyšší v xylenu.



Obr. 13 a) Vlna merino xylen denní světlo b) Vlna merino voda denní světlo

Z obr. 13 je jasně zřetelné, že vlna merino v imerzním prostředí vody nemá ani zdaleka takovou intenzitu záření, jako v xylenu. Přesto byla vlna merino nejlépe zobrazeným materiálem v prostředí vody. Tato metoda se neosvědčila.



Obr. 14 Směs PES Vlna xylen denní světlo

Pro zajímavost byl vytvořen vzorek ze směsi polyesteru a vlny (obr. 14), aby byl vidět jasný rozdíl v intenzitě vyzařování mezi přírodním a syntetickým materiálem. Světlé body v obrázku jsou vlna, tmavší je polyester.

8.1 Pozorování pomocí modrého fluorescenčního filtru

Fluorescenční mikroskop nabízí pozorování různými fluorescenčními filtry a jejich kombinací. Tyto filtry se liší propustností různých vlnových délek a můžeme tak pozorovat emitované světlo i v jiných barvách, než jenom modré (viz kap 3.2). Na aparatuře, která se nachází v laboratoři katedry KHT (Katedra hodnocení textilií), je bohužel pouze k dispozici filtr, který propouští modrou barvu a pořízení dalších nebylo možné. Přesto se podařilo vytvořit zajímavé snímky, z kterých bylo možné naměřit užitečná data.

9. Analýza barevného obrazu

Po vytvoření barevných obrazů příčných řezů vláken přišla na řadu jejich analýza. U každého materiálu bylo vytvořeno tolik snímků, aby se v nich dalo najít alespoň 50 měřitelných objektů (řezů). Analýza byla prováděna v softwaru Nis-elements (viz kap 6.2). Zde se používalo přímé měření objektů, za použití kombinace automatické detekce a subjektivního označování. Měřené parametry byly tyto: MeanIntensity, MeanBlue, IntensityVariation, HueTypical, HueVariation, MeanSaturation, MeanBrightness, BrightVariation, souřadnice s systému CIE xyz. Jejich význam je popsán v teoretické části (viz kap. 6.2).

Z takto získaných údajů byly vytvořeny tabulky a pomocí softwaru QC. Expert byly údaje dále zpracovávány. Tento software umožnil odstranit vybočující hodnoty měření a testoval normalitu každého rozdělení. Rozdělení určil software ve všech případech jako normální. Po těchto krocích následovala statistická analýza, která určila průměry všech parametrů a jejich horní a dolní meze. Z těchto hodnot bylo poté možné vytvořit grafy. Každý graf má na ose x světelné a imerzní prostředí, ve kterém bylo měření prováděno a na ose y číselnou hodnotu parametru. Všechny grafy ale není možné do této práce vložit, proto v jsou příloze jen ukázkově pro jeden materiál.

9.1 Určení rozhodujících parametrů

Díky vytvoření grafů bylo možné subjektivně posoudit, které parametry barevného obrazu budou pro výsledek této práce nejdůležitější.

Parametry MeanIntensity (střední intenzita záření), MeanBlue (střední hodnota záření modré složky) a Mean Brightness (střední intenzita jasu) měly u grafů všech materiálů stejný průběh, pro různá prostředí. Je to způsobeno tím, že fluorescenční mikroskop má pouze jeden barevný filtr modré barvy a v podstatě průměrná intenzita záření je i intenzita modré. Dále se ukázalo, že čím materiály vykazují vyšší fluorescenci, tím vyzařují jasněji. Proto i úroveň jasu a průměrné intenzity záření jsou na sobě závislé. Pozitivním zjištěním ale bylo, že pro různé materiály se tyto hodnoty výrazně lišily.

Další parametr, HueTypical (typický odstín) bylo také možné vyřadit, jelikož ve všech případech ukazoval na odstín modré.

Hodnota MeanSaturation (střední sytost) také u všech materiálů nevykazovala výrazné odchylky a parametry x, y v souřadnicích CIE xyz (viz kap. 6.1) vždy ukazovaly na stejné místo.

Jako nejdůležitější parametr se tedy ukázal MeanIntensity. Byla u něj tedy testována shodnost jednotlivých rozdělení, pro jednotlivá textilní vlákna v různých imerzních prostředích. Testování probíhalo pomocí dvou-výběrového K-S testu [1], který testuje míru difference mezi dvěma výběry prostřednictvím distribučních funkcí na zvolené hladině významnosti. Výpis shodných rozdělení se nachází v tabulce (viz tab. 3).

9.2 Průměrná intenzita záření (MeanIntensity)

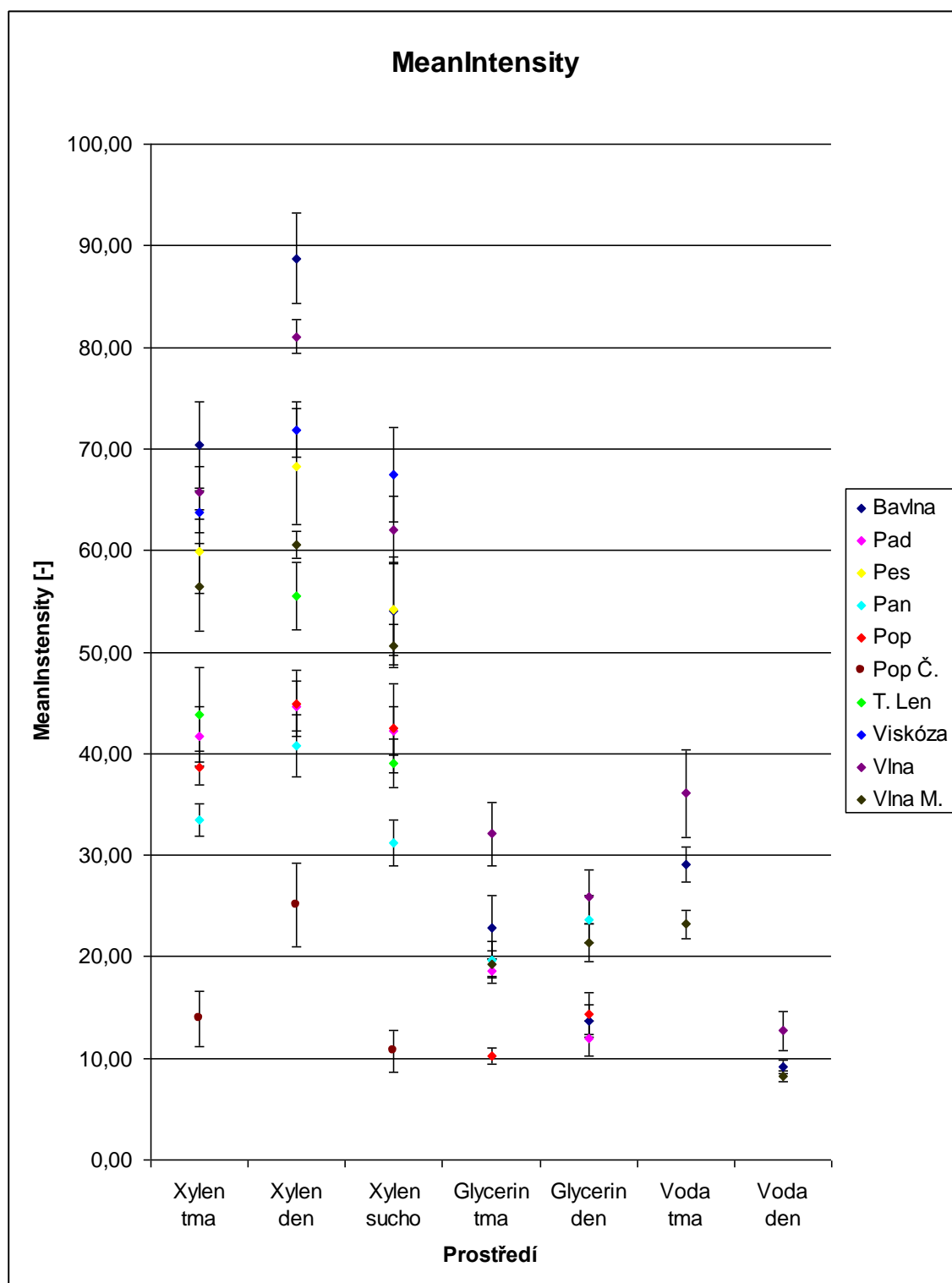
Průměrnou intenzitu záření (MeanIntensity) měl každý materiál rozdílnou. Závisí to hlavně na obsahu fluoforů, které způsobují emisi fotonů. Největší intenzitu záření vyvolávaly přírodní materiály. V následující tabulce jsou vypsány její hodnoty pro jednotlivá prostředí a materiály. Tato data jsou pak zpracována do grafu, ve kterém je vidět, jak moc se jednotlivé materiály touto vlastností od sebe liší. Hodnoty v grafu (obr. 15) jsou aritmetické průměry naměřených hodnot a jejich meze.

V grafu (obr. 15) je vidět, že vždy byla intenzita záření nejvyšší u měkkých řezů v prostředí xylenu a při měření v denním světle. V tomto prostředí také vyšel nejmenší počet shodností rozdělení jednotlivých materiálů. Ve většině případů pak byla druhá nejvyšší intenzita záření při měření v tmavém prostředí a lehce nižší u zaschlého xylenu, kde ale došlo k vyššímu počtu shod. Dále je vidět, že data naměřená v prostředí glycerinu a vody vykazují nízkou hodnotu intenzity záření a z toho důvodu je i většina rozdělení shodných. Z grafu tedy vyplývá, že měření příčných řezů vláken je nevýhodnější provádět za denního světla v imerzním prostředí xylenu.

Prázdná místa v tabulkách (tab. 2, tab. 4) značí, že se nepodařilo vytvořit v daném prostředí obraz na mikroskopu, proto ani nebylo možné změřit data. Důvody jsou popsány výše (viz kap. 8).

Tab. 2 Přehled nejdůležitějších naměřených hodnot – MeanIntensity [-]

	Bavlna	PAD	PES	PAN	POP	POP černý	T. Len	Viskóza	Vlna	Vlna merino
Xylen tma	70,33	41,73	59,92	33,46	38,60	13,90	43,79	63,81	65,68	56,40
95% IS	<66,07; 74,58>	<38,82; 44,65>	<55,79 64,04>	<31,86; 35,05>	<36,90; 40,30>	<11,18; 16,62>	<39,17; 48,42>	<61,81; 65,80>	<63,07; 68,29>	<52,04; 60,76>
Xylen den	88,78	44,65	68,26	40,81	44,95	25,12	55,51	71,91	81,08	60,58
95% IS	<84,37; 93,18>	<42,19; 47,11>	<62,56; 73,97>	<37,74; 43,89>	<41,68; 48,21>	<21,01; 29,23>	<52,19; 58,83>	<69,19; 74,62>	<79,40; 83,75>	<59,24; 61,93>
Xylen sucho	54,01	42,24	54,25	31,20	42,53	10,70	39,07	67,43	62,00	50,56
95% IS	<48,69; 59,32>	<39,87; 44,61>	<49,66; 58,84>	<28,97; 34,30>	<38,12; 46,93>	<8,70; 12,71>	<36,69; 42,32>	<62,77; 72,10>	<59,68; 65,32>	<48,41; 52,71>
Glycerin tma	22,91	18,58		19,68	10,19				32,12	19,32
95% IS	<19,84; 25,97>	<17,36; 19,80>		<17,88; 21,49>	<9,38; 11,01>				<29,00; 35,25>	<18,09; 20,54>
Glycerin den	13,70	11,97		23,68	14,41				25,90	21,40
95% IS	<12,07; 15,32>	<10,22; 13,72>		<21,39; 25,98>	<12,41; 16,40>				<23,21; 28,60>	<19,52; 23,29>
Voda tma	29,09								36,07	23,19
95% IS	<27,34; 30,85>								<31,80; 40,34>	<21,78; 24,61>
Voda den	9,14								14,60	8,26
95% IS	<8,49; 9,79>								<12,70; 16,50>	<7,76; 8,77>



Obr. 15 Graf MeanIntensity (průměrná intenzita záření)

9.3 Shodná rozdělení výběrů průměrné intenzity záření

Tab. 3 Materiály se shodným rozdělením

Xylen tma	Xylen den	Xylen sucho
PAD - T. Len PES - Vlňa PAD - POP PES - Vlňa M. POP - Vlňa M.	PAD - POP PAN - POP PAN -PAD PES - VS	Bavlna - PES Bavlna - Vlňa M. PAD - POP PAD - Vlňa PES - Vlňa M. PAN - Viskóza POP - Vlňa

Výpis shodných rozdělení výběrů (viz tab.3) ukazuje, že nejméně shodných výběrů najdeme v imerzním prostředí xylenu při měření za denního světla. Je to způsobeno tím, že zachytáváme nejvyšší intenzitu záření vláken (viz obr. 15), přičemž její horní a dolní meze se pohybují v podobných vzdálenostech, jako při měření s nižší intenzitou záření (např. xylene tma). Tím se zvětšují vzdálenosti mezi jednotlivými výběry.

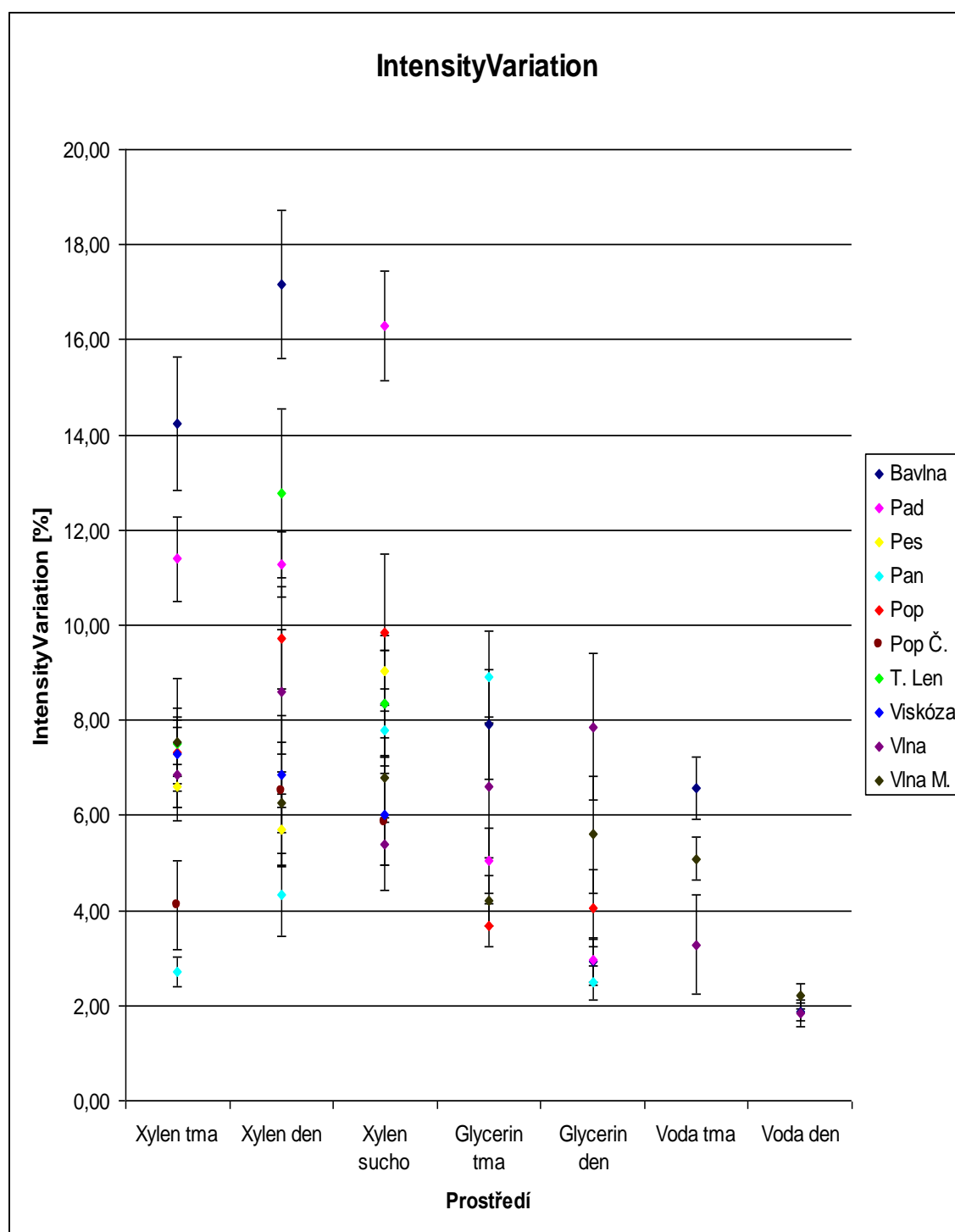
Toho můžeme využít při pokusech o identifikaci řezů vláken pomocí měření parametrů barevných obrazů. Čím méně shodných rozdělení najdeme, tím snažší bude identifikace pomocí změření parametru průměrné intenzity záření.

9.4 Variace intenzity záření (IntensityVariation)

V další tabulce a grafu (tab.4, obr. 16) je zpracován parametr IntensityVariation (variace intenzity záření), který ukazuje variace v naměřených intenzitách záření, v jednotlivých řezech vlákny. V podstatě se dá říci, že čím je v bodě více světlých a tmavých míst dohromady, tím tento parametr roste. Nejvíce tento parametr vzrostl u bavlny, což je přírodní vlákno a jeho vnitřní struktura není stejná. Dále u polyamidu, kde je to způsobeno matováním, které vytvářelo fluorescenci.

Tab. 4 Přehled nejdůležitějších naměřených hodnot – IntensityVariation [%]

	Bavlna	PAD	PES	PAN	POP	POP černý	T. Len	Viskóza	Vlna	Vlna merino
Xylen tma	14,23	11,39	6,61	2,72	7,33	4,11	7,51	7,29	6,87	7,54
95% IS	<12,82; 15,63>	<10,51; 12,28>	<6,16; 7,07>	<2,40; 3,04>	<6,66; 8,01>	<3,18; 5,05>	<6,16; 8,86>	<6,52; 8,05>	<5,88; 7,85>	<6,81; 8,26>
Xylen den	17,15	11,29	5,69	4,34	9,73	6,51	12,77	6,85	8,61	6,27
95% IS	<15,60; 18,71>	<10,60; 11,97>	<4,94; 6,44>	<3,46; 5,21>	<8,66; 10,80>	<4,92; 8,11>	<11,00; 14,54>	<6,18; 7,53>	<7,30; 9,91>	<5,64; 6,91>
Xylen sucho	8,35	16,29	9,05	7,77	9,84	5,85	8,35	6,00	5,40	6,79
95% IS	<7,23; 9,47>	<15,14; 17,45>	<8,31; 9,78>	<6,88; 8,67>	<8,18; 11,51>	<4,44; 7,26>	<7,23; 9,47>	<4,97; 7,03>	<4,95; 5,86>	<5,96; 7,62>
Glycerin tma	7,92	5,03		8,90	3,69				6,59	4,20
95% IS	<6,76; 9,08>	<4,35; 5,72>		<7,94; 9,87>	<3,23; 4,16>				<5,10; 7,08>	<3,66; 4,74>
Glycerin den	2,92	2,95		2,48	4,05				7,86	5,60
95% IS	<2,42; 3,42>	<2,50; 3,40>		<2,13; 2,84>	<3,23; 4,87<				<6,31; 9,42>	<4,37; 6,84>
Voda tma	6,58								3,28	5,09
95% IS	<5,93; 7,24>								<4,33; 5,23>	<4,64; 5,54>
Voda den	1,88								1,83	2,20
95% IS	<1,69; 2,07>								<1,55; 2,10>	<1,94; 2,46>



Obr. 16 Graf IntensityVariation (variací intenzity záření)

10. Diskuse

V teoretické části bylo cílem získat přehled o metodách tvorby příčných řezů vláken, fluorescenční mikroskopii, její propojení s textilem a zpracování barevného obrazu. Tvorba příčných řezů je většině lidí, pohybujících se v textilním odvětví, relativně známá, proto jsou v předkládané práci pro tuto část vybrány pouze základní informace. To samé platí pro popis zkoumaných vláken. U pojmu fluorescence už to tak není, bylo snahou co nejsrozumitelněji popsat, jak vzniká, co ji vyvolává a jaké jsou její druhy. Dále byl vysvětlen základní princip funkce světelného mikroskopu a popsány jeho části. To je důležité pro pochopení funkce fluorescenčního mikroskopu, jelikož je dalším vývojovým stupněm světelného mikroskopu. Jeho princip fungování je ve své podstatě velice jednoduchý, avšak konstrukce velmi náročná a drahá, protože je potřeba zajistit výkonné a kvalitní optické součásti. Poslední část je zaměřena na princip zachycení obrazu a jeho digitalizaci. Tato část byla pro mě velice zajímavá, jelikož se digitálnímu focení věnuji a doufám, že lidem, kteří těchto metod používají denně v práci, či volném čase, pomůžu pochopit základní princip této funkce. Bylo také nutné vysvětlit pojem barva, jak vzniká a jak je vědecky popsána. Na závěr jsou vypsány a vysvětleny parametry softwaru Nis – elements, podle nichž se výsledky celé práce posuzují.

Prvním cílem praktické části bylo vytvořit příčné řezy vláken. Nejdříve byly vyráběny bločky pro výrobu měkkých řezů, dále pak řezy z ručního mikrotomu. Výroba proběhla zdárně.

Při následném zkoumání na fluorescenčním mikroskopu se potvrdil předpoklad, že různé imerzní prostředí bude mít vliv na kvalitu vytvářených snímků. Vyvodil jsem tedy závěry, že pro zkoumání příčných řezů vláken na fluorescenčním mikroskopu, je jednoznačně nejlepší metoda zkoumání měkkých řezů, v imerzním prostředí xylenu. Mikroskop, nastavený na režim automatické doby expozice, určený pro zkoumání fluorescence, dokázal zachytit snímky všech druhů vláken. Někdy byla spíše zřetelná fluorescence disperzního lepidla, které sloužilo k fixaci vláken a samotná vlákna byla jenom tmavými body v jeho středu. I tak se ale daly změřit jejich parametry a minimální záření, které emitují. Při vyschnutí xylenu změnilo okolní prostředí svojí barvu, stalo se členité a bylo velice obtížné vlákna hledat. Podařilo se ale získat snímky, z kterých bylo možné měřit parametry. Řezy z ručního mikrotomu v imerzním prostředí glycerinu bych

pro zkoumání touto metodou nedoporučoval. Fluorescenční mikroskop dokázal kvalitně zachytit pouze přírodní vlákna bavlnu a oba použité druhy vln. U několika syntetických vláken bylo také možné vytvořit jejich snímky, které ale byly nekvalitní. Mikroskop s obtížemi nastavoval dobu expozice, která byla velmi dlouhá. V imerzním prostředí vody byla tato situace podobná, jako při měření v prostředí glycerinu. Potvrdil se také předpoklad, který mi sdělila Ing. Ocheretná, že při měření hraje svojí roli okolní světelné prostředí. Snímky měly jiné barevné parametry ve tmě a v denním světle. S tím jsem se musel vyrovnat tak, že jedna sada snímků byla vytvářena v odpoledních hodinách, druhá v nočních hodinách, kdy byla v laboratoři úplná tma.

Software Nis – elements nabízí měření celé řady parametrů. Pro účel této práce bylo po uvážení vybráno deset nejdůležitějších (viz kap. 6.2). Po jejich naměření jsem z vypsanych důvodů (viz kap. 9.1), rozhodl vybrat průměrnou intenzitu záření. Každé vlákno má tento parametr odlišný a má na něj také vliv použítá technika výroby příčných řezů a použité imerzní prostředí. Přírodní vlákna tedy měla průměrnou intenzitu obecně vyšší ve všech použitých prostředích než vlákna syntetická. Na tento parametr ale mohou působit vlivy jako použité matování v syntetických vláknech apod. Data byla aritmeticky zprůměrnována, vložena do tabulek, zjištěny intervaly spolehlivosti a z nich vyrobeny grafy. **Analýzou dat bylo zjištěno, že nevhodnější je používat měkké řezy v imerzním prostředí xylenu, jelikož tak dokážeme zachytit a změřit všechny druhy vláken. Výhodnější bylo měření ve dne (12 - 15 hodin), protože doba automatické expozice byla delší, oproti měření v noci. Bylo tak možné zachytit vyšší intenzitu záření, u které měl nejmenší počet materiálů shodné rozdělení (viz tab. 3), což může posloužit při pokusech o identifikaci textilních vláken pouze pomocí měření fluorescenčních parametrů řezů vláken.** Poté byla ještě hodnocena variabilita záření a potvrdilo se, že nejvyšší je u některých přírodních materiálů, jako bavlna a len, které nemohou mít tak stejnou strukturu jako vlákna syntetická. Variabilita byla vysoká i u vláken s matováním.

Závěrem zhodnotím dosažené cíle práce. Úkol zhotovit příčné řezy vláknů různými laboratorními technikami se zdařil.

Úkol vytvořit snímky příčných řezů textilních vláken na fluorescenčním mikroskopu bylo možné splnit jen z části, protože některé z řezů mikroskop vůbec nedokázal zachytit kvůli jejich malé fluorescenci. Tím se ukázalo, jaké laboratorní techniky jsou pro tyto pokusy vhodné (viz výše).

Měření charakteristik těchto obrazů dopadlo úspěšně, ale limitujícím faktorem byla možnost používat pouze jeden fluorescenční filtr, takže některé charakteristiky nám říkaly to samé, nebo jejich hodnocení bylo bezpředmětné (viz kap. 8.1).

Typické intervaly charakteristik barevných obrazů se podařilo vytvořit, jejich část je ukázána a graficky zpracována v experimentální části (viz kap. 9.2 a 9.3). Z důvodu jejich velkého množství je zbytek uveden v přílohách 1 - 10.

Závěr

Rozvoj textilního průmyslu není zdaleka u konce, zdokonalují se techniky výroby vláken, jejich zpracovávání i samotné vlastnosti. K tomu je potřeba, aby i metody jejich zkoumání byly stále zdokonalovány. A jednou z cest může být i používání fluorescenčního mikroskopu.

I když jeho hlavním odvětvím, kde se používá, je biologie, může najít svoje uplatnění i v laboratořích pracovníků, analyzujících strukturu textilních vláken. Při vhodném vybavení je možnost zkoumat vlastnosti barvených materiálů, nebo jinak chemicky upravených vláken. Také by bylo možné používat měření parametrů barevných obrazů k identifikaci vláken. Pokud by nešlo pouhým pohledem světelného mikroskopu zjistit, o jaký materiál se jedná, mohla by tato metoda pomoci. Identifikace textilních vláken pomocí fluorescenční mikroskopie bylo již prováděno v archeologii (viz kap. 5.1) a za předpokladu sestavení přesných tabulek barevných parametrů vláken je možné použití i v běžné praxi.

Pro pokračující výzkum možností fluorescenční mikroskopie na této škole je třeba vybavit fluorescenční mikroskop další sadou filtrů, propouštějící jiné vlnové délky a také vybavit laboratoř komorou, kde by se daly zajistit konstantní světelné podmínky.

Použitá literatura

- [1] Anděl, J.: *Statistické metody*, Matfyzpress, Praha, 1993
- [2] Černý, J. *Fluorescenční mikroskopie*. Mgr. Jan Černý PhD.[on-line].
[cit. 19.1.2010]. Dostupné z
<<http://www.otevrenaveda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/3cerny.pdf>>.
- [3] *Fluorescence*. [on-line]. [cit. 12.1.2010].
<<http://icecube.berkeley.edu/~bramall/work/astrobiology/fluorescence.htm>>.
- [4] *Fluorescenční mikroskopie*. [on-line].[cit. 28.2010]. Dostupné z:
<<http://biologie.upol.cz/mikroskopie/fluorescencni%20mikroskopie.htm>>.
- [5] *History of the Microscope*. [on-line]. [cit.9.1.2010]. Dostupné z
<http://inventors.about.com/od/mstartinventions/a/microscope_2.htm>.
- [6] Hlaváč V., Sedláček M., *Zpracování signálů a obrazů a signálů*. Vydavatelství ČVUT, Praha, 2000, [cit. 2.3.2010]. ISBN 80-01-02114-9.
- [7] Hlaváč V., Šonka M., *Počítačové vidění*, Garada, Praha, 1992, [cit. 2.3.2010] ISBN 80-85424-67-3.
- [8] Hofr, C. *Fluorescenční mikroskopie*. [on-line].[cit. 26.1.2010]. Dostupné z:
<http://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi7230/um/3973768/12_mikroskopie.pdf>.
- [9] Křemenáková D. a kol.: *Soubor interních norem*. [on-line] .2001. [cit. 6.2.2010].
Dostupné z <<http://ft.tul.cz/depart/ktt/default.htm>>.
- [10] Laboratory Imaging: *NIS-Elements Verze 2.30, Uživatelská příručka*, Praha, 2006.

- [11] Lakowicz J. R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*: Joseph R. Lakowicz. [on-line]. London: Springer, 2006. [cit. 12.3.2010]. Dostupné z <<http://books.google.com/books?id=-PSybuLNxcAC&printsec=frontcover&dq=Principles+of+fluorescence+spectroscopy:&hl=cs&cd=1#v=onepage&q&f=false>>. ISBN: 9780387312781.
- [12] *Luminiscence*. Wikipedia otevřená encyklopedie. [on-line]. c2002, poslední revize 10.5.2009. [cit. 18.9.2009]. Dostupné z <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Luminiscence>>.
- [13] *Manipulating colors in .NET - Part 1*. [on-line]. [cit. 1.3.2010]. Dostupné z <<http://www.codeproject.com/KB/recipes/colospace1.aspx?msg=2703260>>
- [14] *Mikrotom*. Wikipedia otevřená encyklopedie. [on-line]. 22.5.2009. [cit. 20.12.2009]. Dostupné z <<http://de.wikipedia.org/wiki/Mikrotome>>.
- [15] Militký, J.: *Přednášky Textilní vlákna + návody na cvičení*. Leden 2007. Technická univerzita v Liberci. [cit. 16.2.2010]. ISBN 978-80-7372-169-5.
- [16] Müller, M.: *Identification of single archaeological textile fibres from the cave of letters using synchrotron radiation microbeam diffraction and microfluorescence*. Retrieved 3.[on-line]. 2006, march 1. [cit. 19.12. 2009]. Dostupné z <<http://www.springerlink.com/content/cnv743252116227q/fulltext.pdf>>. ISSN 0947-8396.

- [17] Müller, M.: *Introductin to confocal fluorescence microscopy*. [on-line]. Bellingham: SPIE Press, 2006. [cit. 27.11.2008]. Dostupné z <<http://books.google.com/books?id=t7N4G4x9zGcC&printsec=frontcover&dq=Introductin+to+confocal+fluorescence+microscopy&hl=cs&cd=1#v=onepage&q&f=false>>. SBN: 0819460435.
- [18] *Olympusmicro.com Fluorescence Microscopy*. [on-line]. [cit. 18.2.2010]. Dostupné z: <<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>>
- [19] *Optické mikroskopy*. [on-line]. [cit. 10.1.2010]. Dostupné z <http://www.fch.vutbr.cz/~zmeskal/obring/presentace_2003/04_opticke_mikroskopy.pdf>
- [20] Reichman, J. *Chroma Handbook of optical filters for fluorescence microscopy*. [on-line]. (1998, june). [cit. 3.2.2010]. Dostupné z: <<http://depts.washington.edu/keck/handbook3.pdf>>
- [21] Serra, J.: *Image Analysis and Mathematical Morphology*, Academic Press, London, 1982. ISBN 0126372403.
- [22] *Úvod do praktické histologie*. [on-line]. [cit. 12.2.2010]. Dostupné z <trimed.lf3.cuni.cz/files/hist_uvod.doc>
- [23] Víková, M.: *Mikroskopie II*. [on-line]. [cit. 22.1.2010]. Dostupné z <http://www.ft.tul.cz/depart/ktc/sylaby/Textilni_Fyzika/5.Mikroskopie%20II.pdf>.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma světelného mikroskopu.....	13
Obrázek 2: Fluorescenční mikroskop Olympus IX 70	15
Obrázek 3: Základní schéma průchodu světla epifluorescenčním mikroskopem	16
Obrázek 4: Schéma epifluorescenčního mikroskopu.....	17
Obrázek 5: Schéma transmisního fluorescenčního mikroskopu.....	17
Obrázek 6: Jablonského diagram fluorescence.....	19
Obrázek 7: Diagram barevného obrazu v souřadnicovém systému CIE....	24
Obrázek 8: Polyamid a) režim světelného mikroskopu b) režim fluorescence	29
Obrázek 9 a) Polyester černý xylen tma b) Bavlna xylen tma.....	29
Obrázek 10: a) Vlna merino xylen tma b) Vlna merino xylen denní světlo.	30
Obrázek 11: a) PES sucho b) PES xylen noc.....	30
Obrázek 12: a) Vlna glycerin denní světlo b) Vlna xylen denní světlo.....	31
Obrázek 13: a) Vlna merino xylen denní světlo b) Vlna merino voda denní světlo	31
Obrázek 14: Směs PES Vlna xylen denní světlo.....	32
Obrázek 15: Graf MeanIntensity (průměrná intenzita záření).....	36
Obrázek 16: Graf IntensityVariation (variace intenzity záření).....	39

Seznam tabulek

Tabulka 1: Použité materiály	26
Tabulka 2: Přehled nejdůležitějších naměřených hodnot – MeanIntensity [-]...	35
Tabulka 3: Materiály se shodným rozdělením.....	37
Tabulka 4: Přehled nejdůležitějších naměřených hodnot – IntensityVariation [%].	38

Seznam příloh

- Příloha 1** - Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - bavlna
- Příloha 2** - Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - polyamid
- Příloha 3** - Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - polyakrylnitril
- Příloha 4** - Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - polyester
- Příloha 5** - Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - polypropylen černý
- Příloha 6** - Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - polypropylen
- Příloha 7** - Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - technický len
- Příloha 8** - Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - viskóza
- Příloha 9** - Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - vlna
- Příloha 10** - Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - vlna merino
- Příloha 11** - Snímky materiálů

Příloha č.1 – Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - bavlna

	Mean Intensity	Mean Blue	Hue Typical	Hue Variation	Mean Saturation	Intensity Variation	Mean Brightness	Brigit Variation	x	y
Xylen noc	70,33	115,12	142,16	4,40	198,04	14,23	27,58	5,58	0,23	0,28
95% IS	<66,07; 74,58>	<107,94; 122,31>	<141,55; 142,78>	<3,89; 4,91>	<196,68; 199,39>	<12,82; 15,63>	<25,91; 29,25>	<5,03; 6,13>	<0,23; 0,23>	<0,28; 0,28>
Xylen den	88,78	141,58	140,99	3,96	194,78	17,15	34,81	6,73	0,23	0,29
95% IS	<84,37; 93,18>	<136,36; 146,80>	<140,02; 141,96>	<3,56; 4,36>	<192,56; 196,99>	<15,60; 18,71>	<33,09; 36,54>	<6,12; 7,34>	<0,23; 0,23>	<0,28; 0,29>
Xylen sucho	54,01	83,57	137,45	4,87	197,74	8,35	21,18	3,27	0,23	0,30
95% IS	<48,69; 59,32>	<75,61; 91,52>	<136,31; 138,60>	<4,45; 5,28>	<194,66; 200,82>	<7,23; 9,47>	<19,09; 23,26>	<2,83; 3,71>	<0,23; 0,23>	<0,29; 0,30>
Glycerin noc	22,91	44,13	152,49	5,29	220,33	7,92	8,98	3,10	0,21	0,23
95% IS	<19,84; 25,97>	<38,86; 49,40>	<151,72; 153,27>	<4,79; 5,79>	<217,79; 222,86>	<6,76; 9,08>	<7,78; 10,19>	<2,65; 3,56>	<0,20; 0,21>	<0,22; 0,23>
Glycerin den	13,70	26,53	162,80	2,93	156,76	2,92	5,37	1,14	0,22	0,20
95% IS	<12,07; 15,32>	<23,44; 29,62>	<162,06; 163,54>	<2,71; 3,14>	<154,73; 158,80>	<2,42; 3,42>	<4,73; 6,01>	<0,95; 1,34>	<0,21; 0,22>	<0,20; 0,21>
Voda noc	29,09	57,93	153,19	2,99	230,08	6,58	11,41	2,58	0,20	0,22
95% IS	<27,34; 30,85>	<54,98; 60,87>	<152,51; 153,88>	<2,80; 3,18>	<228,46; 231,71>	<5,93; 7,24>	<10,72; 12,10>	<2,32; 2,84>	<0,20; 0,20>	<0,22; 0,23>
Voda den	9,14	19,80	166,61	2,40	170,08	1,88	3,58	0,74	0,20	0,16
95% IS	<8,49; 9,79>	<18,40; 21,19>	<166,01; 167,20>	<2,21; 2,60>	<169,27; 170,90>	<1,69; 2,07>	<3,33; 3,84>	<0,66; 0,81>	<0,20; 0,20>	<0,16; 0,17>

Příloha č.2 – Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - polyamid

	Mean Intensity	Mean Blue	Hue Typical	Hue Variation	Mean Saturation	Intensity Variation	Mean Brightness	Brigit Variation	x	y
Xylen noc	41,73	75,34	150,36	3,29	197,42	11,39	16,37	4,47	0,22	0,25
95% IS	<38,82; 44,65>	<70,19; 80,50>	<150,02; 150,70>	<3,12; 3,45>	<195,09; 199,74>	<10,51; 12,28>	<15,22; 17,51>	<4,12; 4,81>	<0,22; 0,22>	<0,25; 0,25>
Xylen den	44,65	71,99	147,18	4,84	162,50	11,29	17,51	4,43	0,24	0,27
95% IS	<42,19; 47,11>	<67,89; 76,10>	<146,51; 147,85>	<4,37; 5,31>	<158,54; 166,46>	<10,60; 11,97>	<16,54; 18,47>	<4,16; 4,69>	<0,24; 0,24>	<0,27; 0,27>
Xylen sucho	42,24	73,04	146,83	3,44	199,03	16,29	16,56	6,39	0,22	0,26
95% IS	<39,87; 44,61>	<69,04; 77,04>	<146,52; 147,13>	<3,28; 3,60>	<197,39; 200,67>	<15,14; 17,45>	<15,64; 17,49>	<5,94; 6,84>	<0,22; 0,22>	<0,26; 0,27>
Glycerin noc	18,58	37,04	152,23	3,71	228,76	5,03	7,29	1,97	0,20	0,23
95% IS	<17,36; 19,80>	<34,60; 39,49>	<151,88; 152,57>	<3,47; 3,94>	<226,83; 230,68>	<4,35; 5,72>	<6,81; 7,77>	<1,70; 2,24>	<0,20; 0,20>	<0,23; 0,23>
Glycerin den	11,97	24,11	163,09	2,74	162,17	2,95	4,69	1,16	0,21	0,19
95% IS	<10,22; 13,72>	<20,48; 27,74>	<162,57; 163,61>	<2,26; 3,22>	<161,28; 163,06>	<2,50; 3,40>	<4,01; 5,38>	<0,98; 1,33>	<0,21; 0,21>	<0,19; 0,20>

Příloha č.3 – Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - polyakrylnitril

	Mean Intensity	Mean Blue	Hue Typical	Hue Variation	Mean Saturation	Intensity Variation	Mean Brightness	Brigit Variation	x	y
Xylen noc	43,86	79,98	148,66	2,48	215,32	2,72	17,20	1,07	0,21	0,25
95% IS	<38,90; 48,83>	<71,84; 88,13>	<148,24; 149,08>	<2,30; 2,65>	<212,39; 218,25>	<2,40; 3,04>	<15,25; 19,15>	<0,94; 1,19>	<0,21; 0,22>	<0,25; 0,25>
Xylen den	68,81	121,74	147,78	1,34	207,29	4,34	26,99	1,70	0,22	0,26
95% IS	<55,74; 81,89>	<101,06; 142,42>	<146,41; 149,14>	<1,09; 1,58>	<200,55; 214,02>	<3,46; 5,21>	<21,86; 32,11>	<1,36; 2,04>	<0,21; 0,22>	<0,25; 0,26>
Xylen sucho	68,20	107,78	139,68	3,76	194,68	7,77	26,74	3,05	0,23	0,29
95% IS	<64,97; 71,43>	<103,32; 112,23>	<138,83; 140,53>	<3,44; 4,09>	<192,95; 196,40>	<6,88; 8,67>	<25,48; 28,01>	<2,70; 3,40>	<0,23; 0,23>	<0,29; 0,29>
Glycerin noc	52,68	94,93	148,73	2,42	206,74	8,90	20,66	3,49	0,22	0,25
95% IS	<48,88; 56,49>	<88,52; 101,34>	<148,48; 148,98>	<2,26; 2,58>	<205,57; 207,91>	<7,94; 9,87>	<19,17; 22,15>	<3,11; 3,87>	<0,22; 0,22>	<0,25; 0,25>
Glycerin den	23,68	45,68	165,35	1,40	140,54	2,48	9,29	0,97	0,22	0,20
95% IS	<21,39; 25,98>	<40,96; 50,40>	<165,11; 165,58>	<1,29; 1,51>	<138,97; 142,11>	<2,13; 2,84>	<8,39; 10,19>	<0,83; 1,11>	<0,22; 0,22>	<0,20; 0,20>

Příloha č. 4 – Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - polyester

	Mean Intensity	Mean Blue	Hue Typical	Hue Variation	Mean Saturation	Intensity Variation	Mean Brightness	Brigit Variation	x	y
Xylen noc	59,92	98,28	144,16	3,06	191,13	6,61	23,50	2,59	0,23	0,28
95% IS	<55,79; 64,04>	<92,58; 103,97>	<143,46; 144,86>	<2,82; 3,30>	<188,64; 193,62>	<6,16; 7,07>	<21,88; 25,12>	<2,41; 2,77>	<0,23; 0,23>	<0,27; 0,28>
Xylen den	68,26	113,24	145,56	2,03	189,39	5,69	26,77	2,23	0,23	0,27
95% IS	<62,56; 73,97>	<105,27; 121,21>	<144,60; 146,52>	<1,74; 2,32>	<187,06; 191,73>	<4,94; 6,44>	<24,53; 29,01>	<1,94; 2,53>	<0,23; 0,23>	<0,27; 0,27>
Xylen sucho	54,25	74,79	129,51	4,88	182,06	9,05	21,27	3,55	0,25	0,32
95% IS	<49,66; 58,84>	<68,50; 81,07>	<128,40; 130,63>	<4,50; 5,26>	<179,58; 184,53>	<8,31; 9,78>	<19,47; 23,07>	<3,26; 3,84>	<0,24; 0,25>	<0,32; 0,33>

Příloha č. 5 – Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - polypropylen černý

	Mean Intensity	Mean Blue	Hue Typical	Hue Variation	Mean Saturation	Intensity Variation	Mean Brightness	Brigit Variation	x	y
Xylen noc	13,90	23,71	144,92	4,65	200,59	4,11	5,45	1,61	0,22	0,27
95% IS	<11,18; 16,62>	<19,08; 28,34>	<143,68; 146,17>	<4,04; 5,27>	<195,71; 205,47>	<3,18; 5,05>	<4,38; 6,52>	<1,26; 1,96>	<0,22; 0,22>	<0,26; 0,27>
Xylen den	25,12	37,23	140,40	4,28	158,74	6,51	9,85	2,55	0,24	0,29
95% IS	<21,01; 29,23>	<31,55; 42,90>	<139,16; 141,64>	<3,53; 5,02>	<147,12; 170,37>	<4,92; 8,11>	<8,24; 11,46>	<1,93; 3,18>	<0,24; 0,25>	<0,29; 0,30>
Xylen sucho	10,70	17,18	137,80	6,36	200,60	5,85	4,20	2,29	0,23	0,29
95% IS	<8,70; 12,71>	<13,79; 20,57>	<136,29; 139,31>	<5,22; 7,50>	<197,51; 203,70>	<4,44; 7,26>	<3,41; 4,98>	<1,74; 2,85>	<0,22; 0,23>	<0,28; 0,29>

Příloha č. 6 – Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - polypropylen

	Mean Intensity	Mean Blue	Hue Typical	Hue Variation	Mean Saturation	Intensity Variation	Mean Brightness	Brigit Variation	x	y
Xylen noc	38,60	105,16	147,51	2,41	195,94	7,33	23,77	2,88	0,22	0,26
95% IS	<36,91; 40,30>	<101,21; 109,10>	<146,82; 148,20>	<2,24; 2,58>	<194,37; 197,51>	<6,66; 8,01>	<22,71; 24,83>	<2,61; 3,14>	<0,22; 0,22>	<0,26; 0,26>
Xylen den	44,95	74,17	144,97	2,87	188,15	9,73	17,63	3,81	0,23	0,27
95% IS	<41,68; 48,21>	<69,48; 78,87>	<144,33; 145,61>	<2,66; 3,09>	<186,29; 190,00>	<8,66; 10,80>	<16,35; 18,91>	<3,39; 4,23>	<0,23; 0,23>	<0,27; 0,28>
Xylen sucho	42,53	63,93	135,92	4,53	199,15	9,84	16,68	3,86	0,23	0,30
95% IS	<38,12; 46,93>	<58,76; 69,11>	<134,19; 137,66>	<4,15; 4,90>	<195,73; 202,56>	<8,18; 11,51>	<14,95; 18,40>	<3,21; 4,51>	<0,23; 0,24>	<0,30; 0,31>
Glycerin noc	10,19	20,04	151,87	7,06	212,66	3,69	4,00	1,45	0,20	0,23
95% IS	<9,38; 11,01>	<18,28; 21,80>	<151,33; 152,41>	<6,45; 7,67>	<210,48; 214,85>	<3,23; 4,16>	<3,68; 4,32>	<1,26; 1,63>	<0,20; 0,21>	<0,22; 0,23>
Glycerin den	14,41	24,49	162,65	4,11	104,99	4,05	5,65	1,59	0,24	0,24
95% IS	<12,41; 16,40>	<20,73; 28,24>	<161,01; 164,30>	<3,37; 4,85>	<100,82; 109,16>	<3,23; 4,87>	<4,87; 6,43>	<1,27; 1,91>	<0,24; 0,25>	<0,23; 0,24>

Příloha č. 7 – Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - technický len

	Mean Intensity	Mean Blue	Hue Typical	Hue Variation	Mean Saturation	Intensity Variation	Mean Brightness	Brigit Variation	x	y
Xylen noc	43,79	69,07	141,30	3,31	183,03	7,51	17,17	2,94	0,23	0,29
95% IS	<39,17; 48,42>	<62,06; 76,08>	<140,18; 142,42>	<2,86; 3,77>	<180,47; 185,58>	<6,16; 8,86>	<15,36; 18,99>	<2,41; 3,48>	<0,23; 0,24>	<0,28; 0,29>
Xylen den	55,51	80,14	138,32	5,30	148,61	12,77	21,77	5,01	0,25	0,30
95% IS	<51,19; 59,83>	<72,58; 87,70>	<137,03; 139,60>	<4,97; 5,64>	<142,53; 154,69>	<11,00; 14,54>	<20,07; 23,46>	<4,32; 5,70>	<0,25; 0,25>	<0,30; 0,31>
Xylen sucho	39,07	53,57	137,45	4,87	154,74	8,35	21,18	3,27	0,23	0,30
95% IS	<36,69; 42,32>	<47,61; 60,52>	<136,31; 138,60>	<4,45; 5,28>	<151,66; 157,82>	<7,23; 9,47>	<19,09; 23,26>	<2,83; 3,71>	<0,23; 0,23>	<0,29; 0,30>

Příloha č. 8 – Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu - viskóza

	Mean Intensity	Mean Blue	Hue Typical	Hue Variation	Mean Saturation	Intensity Variation	Mean Brightness	Brigit Variation	x	y
Xylen noc	63,81	114,30	148,28	1,47	204,73	7,29	25,02	2,86	0,22	0,26
95% IS	<61,81; 65,80>	<110,88; 117,72>	<148,07; 148,50>	<1,38; 1,57>	<203,95; 205,52>	<6,52; 8,05>	<24,24; 25,81>	<2,56; 3,16>	<0,22; 0,22>	<0,25; 0,26>
Xylen den	71,91	116,55	145,39	1,93	172,49	6,85	28,20	2,69	0,23	0,28
95% IS	<69,19; 74,62>	<111,20; 121,90>	<144,99; 145,78>	<1,69; 2,16>	<168,68; 176,30>	<6,18; 7,53>	<27,13; 29,26>	<2,42; 2,95>	<0,23; 0,24>	<0,27; 0,28>
Xylen sucho	67,43	118,19	146,79	1,31	204,68	6,00	26,44	2,35	0,22	0,26
95% IS	<62,77; 72,10>	<110,93; 125,46>	<146,22; 147,35>	<1,16; 1,45>	<202,24; 207,11>	<4,97; 7,03>	<24,61; 28,27>	<1,95; 2,76>	<0,22; 0,22>	<0,26; 0,26>

Příloha č. 9 – Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu -vlna

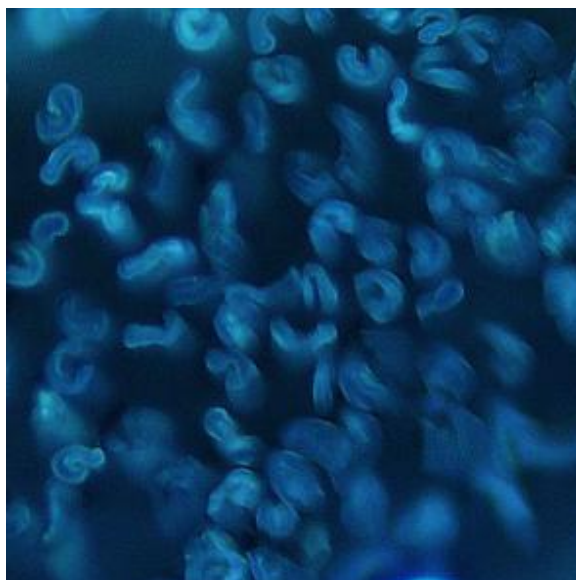
	Mean Intensity	Mean Blue	Hue Typical	Hue Variation	Mean Saturation	Intensity Variation	Mean Brightness	Brigit Variation	x	y
Xylen noc	65,68	111,12	139,16	4,20	194,04	6,87	29,58	4,98	0,24	0,29
95% IS	<63,07; 68,29>	<103,94; 118,31>	<138,55; 139,78>	<3,69; 4,71>	<192,68; 195,39>	<5,88; 7,85>	<27,91; 21,25>	<4,43; 5,53>	<0,24; 0,24>	<0,29; 0,29>
Xylen den	81,08	143,58	141,99	3,85	191,78	8,61	33,81	6,43	0,23	0,29
95% IS	<79,40; 83,75>	<138,36; 148,80>	<141,02; 142,96>	<3,55; 4,25>	<189,56; 192,99>	<7,30; 9,91>	<32,09; 35,54>	<5,82; 7,04>	<0,23; 0,23>	<0,28; 0,29>
Xylen sucho	62,00	86,57	136,45	4,99	198,74	5,40	23,18	3,19	0,23	0,30
95% IS	<58,68; 65,32>	<78,61; 94,52>	<135,31; 137,60>	<4,57; 5,30>	<195,66; 201,82>	<4,95; 5,86>	<21,09; 25,26>	<2,75; 3,66>	<0,23; 0,23>	<0,30; 0,30>
Glycerin noc	32,12	43,13	154,49	5,41	223,33	16,59	7,98	3,15	0,22	0,23
95% IS	<29,00; 35,25>	<37,86; 48,40>	<153,72; 155,27>	<4,91; 5,91>	<220,79; 225,86>	<15,10; 18,08>	<6,78; 9,19>	<2,70; 3,616>	<0,21; 0,22>	<0,23; 0,23>
Glycerin den	25,90	27,53	160,80	2,82	157,76	7,86	5,07	1,21	0,22	0,21
95% IS	<23,21; 28,60>	<24,44; 30,62>	<160,06; 161,54>	<2,60; 3,03>	<155,73; 159,80>	<6,31; 9,42>	<5,43; 6,71>	<1,02; 1,41>	<0,21; 0,22>	<0,21; 0,22>
Voda noc	36,07	53,93	154,19	2,89	228,08	14,28	10,41	2,48	0,20	0,22
95% IS	<31,80; 40,34>	<50,98; 56,87>	<153,51; 154,88>	<2,70; 3,08>	<226,46; 229,71>	<11,33; 17,23>	<9,72; 11,10>	<2,22; 2,74>	<0,20; 0,20>	<0,22; 0,23>
Voda den	14,60	20,80	163,61	2,51	171,08	1,83	2,98	0,69	0,20	0,19
95% IS	<12,70; 16,50>	<19,40; 22,19>	<163,01; 164,20>	<2,32; 2,71>	<170,27; 171,90>	<1,55; 2,10>	<2,73; 3,84>	<0,61; 0,76>	<0,20; 0,21>	<0,19; 0,20>

Příloha č. 10 – Tabulka měřených charakteristik barevného obrazu technický - vlna merino

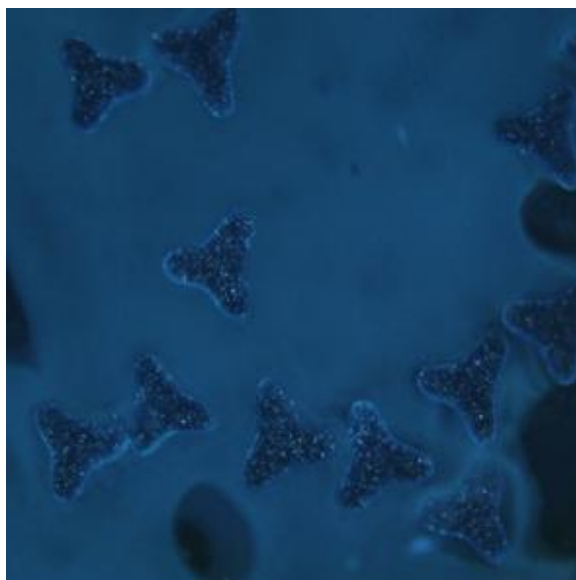
	Mean Intensity	Mean Blue	Hue Typical	Hue Variation	Mean Saturation	Intensity Variation	Mean Brightness	Brigit Variation	x	y
Xylen noc	65,68	103,54	145,94	4,40	192,49	7,54	23,76	2,96	0,23	0,27
95% IS	<59,24; 61,93>	<101,32; 105,75>	<145,25; 146,64>	<3,90; 4,91>	<190,55; 194,44>	<6,81; 8,26>	<23,23; 24,28>	<2,67; 3,24>	<0,22; 0,23>	<0,26; 0,27>
Xylen den	81,08	89,11	149,22	3,07	190,70	6,27	19,83	2,46	0,22	0,25
95% IS	<48,41; 52,71>	<85,82; 92,41>	<148,67; 149,78>	<2,76; 3,38>	<189,10; 192,30>	<5,64; 6,91>	<18,99; 20,67>	<2,21; 2,71>	<0,22; 0,22>	<0,25; 0,26>
Xylen sucho	62,00	100,10	148,10	3,09	204,48	6,79	22,12	2,66	0,22	0,26
95% IS	<52,04; 60,76>	<93,17; 107,02>	<147,31; 148,89>	<2,60; 3,59>	<201,33; 207,63>	<5,96; 7,62>	<20,41; 23,83>	<2,34; 2,99>	<0,22; 0,22>	<0,25; 0,26>
Glycerin noc	32,12	41,31	155,49	4,14	235,85	4,20	7,58	1,65	0,19	0,20
95% IS	<18,09; 20,54>	<38,70; 43,91>	<155,20; 155,78>	<3,81; 4,47>	<234,68; 237,02>	<3,66; 4,74>	<7,10; 8,06>	<1,44; 1,86>	<0,19; 0,19>	<0,20; 0,20>
Glycerin den	25,90	43,14	154,53	4,15	221,44	5,60	8,81	1,98	0,20	0,21
95% IS	<19,52; 23,29>	<40,38; 46,89>	<152,26; 156,79>	<3,56; 4,74>	<220,43; 222,44>	<4,37; 6,84>	<8,28; 9,33>	<1,50; 2,47>	<0,19; 0,20>	<0,20; 0,22>
Voda noc	36,07	48,13	153,69	4,09	235,73	5,09	9,10	2,00	0,20	0,21
95% IS	<21,78; 24,61>	<45,24; 51,02>	<153,52; 153,85>	<3,78; 4,41>	<234,97; 236,48>	<4,64; 5,54>	<8,54; 9,65>	<1,82; 2,17>	<0,20; 0,20>	<0,21; 0,22>
Voda den	14,60	18,02	166,47	2,95	172,40	2,20	3,33	0,86	0,20	0,16
95% IS	<7,76; 8,77>	<16,90; 19,14>	<166,18; 166,77>	<2,45; 3,45>	<171,56; 173,24>	<1,94; 2,46>	<3,07; 3,60>	<0,76; 0,97>	<0,20; 0,20>	<0,16; 0,16>

Příloha č. 11 – Snímky materiálů vytvořené i imerzním prostředím xylenu, v denních hodinách

1) Bavlina



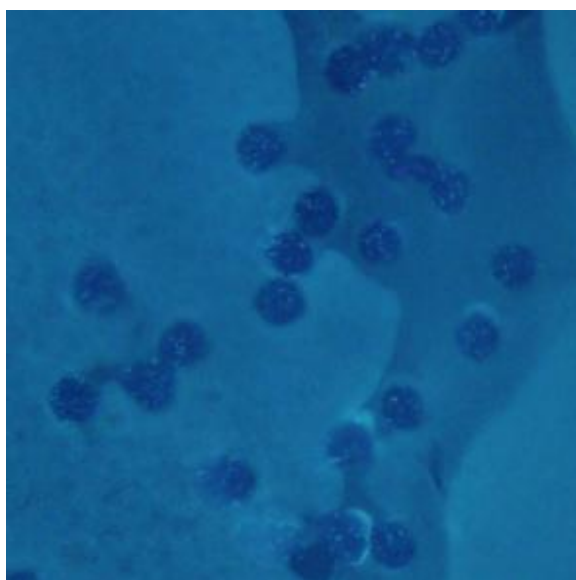
2) Polyamid



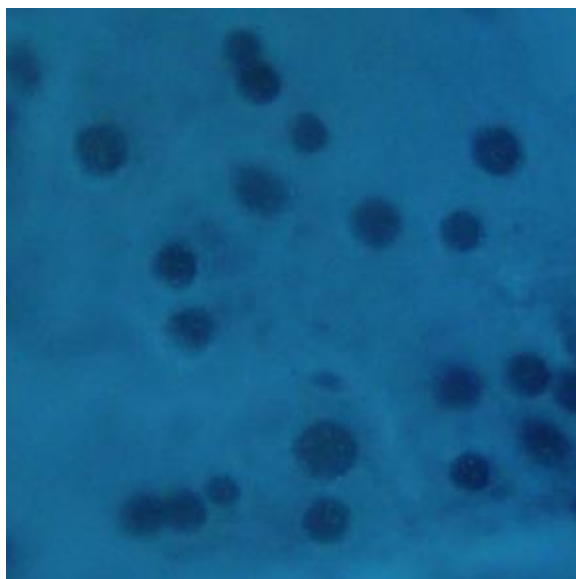
3) Polyakrylnitril



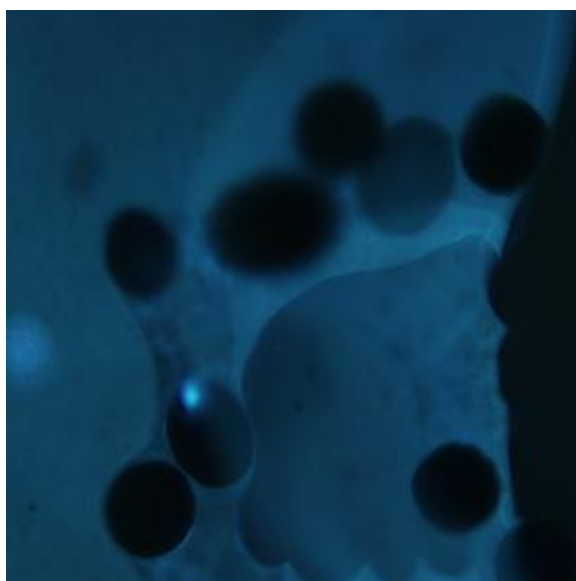
4) Polyester



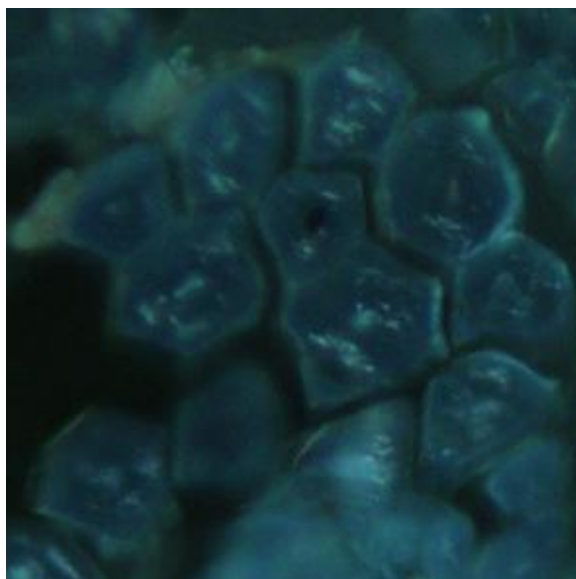
5) Polypropylen



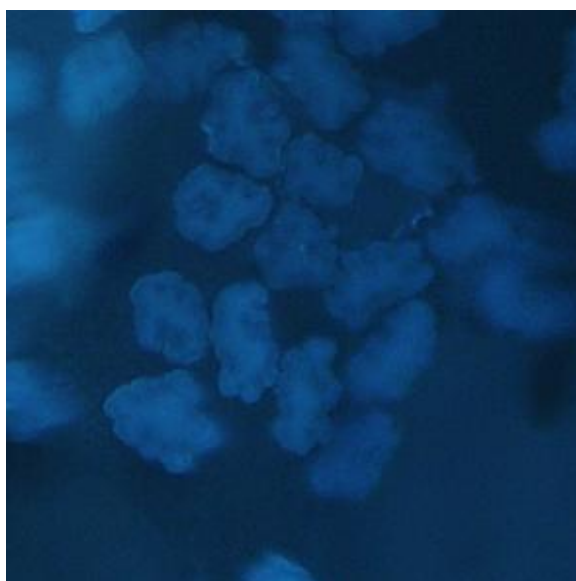
6) Polypropylen černý



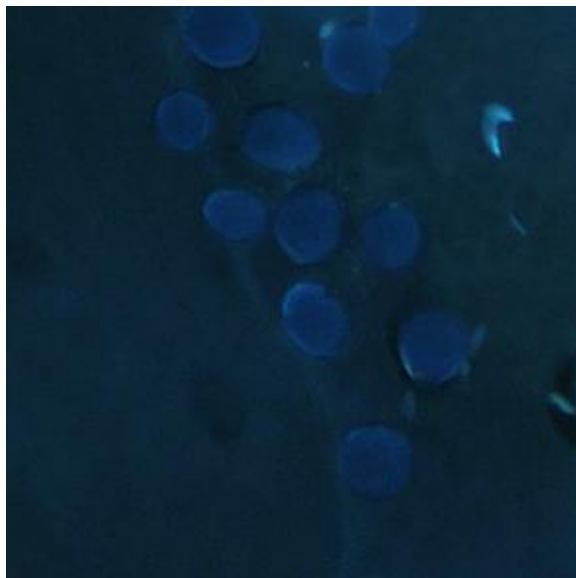
7) Technický len



8) Viskóza



9) Vlna merino



10) Vlna

